



Technische Universität Braunschweig

Institut für Mikrobiologie

Charakterisierung der Antibiotika-Resistenz-Mechanismen  
von *Pseudomonas aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen  
Bedingungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Maike Narten  
aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn  
2. Referent: PD Max Schobert  
eingereicht am: 08.06.2011  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.07.2011

Druckjahr 2011



# Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Professor Dr. Dieter Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **P u b l i k a t i o n e n**

Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Schobert, M., Wiehlmann, L., Jahn, D. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301 (4): 282-92 (2011).

## **E i n g e r e i c h t e P u b l i k a t i o n e n**

Narten, M., Rosin, N., Schobert, M., Tielen, P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. *Research in Microbiology*, eingereicht. (2011)

## **T a g u n g s b e i t r ä g e**

Narten, M., Rosin, N., Häußler, S., Jänsch, L., Jahn, D., Tielen, P. Antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* under urinary tract-like conditions (Poster) VAAM-Jahrestagung, Hannover (2010)

*Meinen Eltern.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.2. Biofilmbildung .....	2
1.3. Pathogenität von <i>P. aeruginosa</i> .....	4
1.4. Harnwegsinfektionen .....	6
1.5. Antibiotika .....	9
1.6. Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i> .....	12
1.7. Zielsetzung .....	15
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1. Materialien .....	16
2.1.1. Verbrauchsmaterial .....	16
2.1.2. Kits .....	16
2.1.3. Enzyme .....	16
2.1.4. Geräte .....	17
2.1.5. Chemikalien .....	18
2.2. Puffer und Lösungen .....	18
2.2.1. Lösungen zur Bestimmung von Uronsäuren .....	18
2.2.2. Antibiotika-Stammlösungen .....	19
2.2.3. PBS-Puffer .....	19
2.2.4. TAE-Puffer .....	20
2.2.5. TE-Puffer .....	20
2.2.6. Plasmid-Minipräparationslösungen .....	20
2.3. Nährmedien .....	21
2.3.1. LB-Medium .....	21

2.3.2. 1:10 LB-Eisenmangelmedium .....	22
2.3.3. Artifizielles Urin Medium (AUM) .....	22
2.4. Verwendete Bakterien-Stämme, Plasmide und Primer .....	24
2.5. Mikrobiologische Methoden .....	26
2.5.1. Stammhaltung und Lagerung von Bakterien .....	26
2.5.2. Photometrische Bestimmung der Zelldichte .....	26
2.5.3. Anzucht von LB-Vorkulturen .....	27
2.5.4. Anzucht von Membranfilter-Biofilmen .....	27
2.5.5. KBE-Bestimmung .....	27
2.5.6. MIC-Bestimmung in Flüssignährmedium .....	28
2.5.7. MIC-Bestimmung auf Agarnährmedium .....	28
2.5.8. Absterbeverhalten planktonischer Zellen unter Antibiotika-Einwirkung .....	29
2.5.9. Kontrolle der Antibiotikastabilität in verschiedenen Nährmedien .....	29
2.5.10. Absterbeverhalten von Biofilmen unter Antibiotika-Einwirkung .....	30
2.5.11. Antibiotikaresistenz-Tests .....	30
2.5.12. Diffusion der Antibiotika durch <i>P. aeruginosa</i> Biofilme .....	30
2.5.13. Absterbeverhalten unter Menadion-Einfluss .....	31
2.6. Biochemische Methoden .....	31
2.6.1. Quantitativer Nachweis von Uronsäuren .....	31
2.6.2. Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies .....	32
2.7. Metabolomanalyse .....	33
2.7.1. Kultivierung der Filterbiofilme und Zellernte .....	33
2.7.2. Kultivierung planktonischer Kulturen und Zellernte .....	34
2.7.3. Derivatisierung und Vermessung der Proben .....	35
2.8. Transkriptomanalyse .....	35
2.8.1. Kulturbedingungen und Zellernte .....	35
2.8.2. RNA-Präparation und Qualitätskontrolle .....	36
2.8.3. Präparation der <i>Agilent Gene Expression Microarrays</i> .....	37
2.8.4. Prozessierung der <i>Agilent Gene Expression Microarrays</i> .....	37
2.9. Molekularbiologische Methoden .....	38

2.9.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	38
2.9.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	38
2.9.3. Quantifizierung von DNA und RNA.....	39
2.9.4. Anwendung von Restriktionsendonukleasen.....	39
2.9.5. Ligation.....	39
2.9.6. Herstellung Rubidium-kompetenter Zellen .....	40
2.9.7. Transformation chemokompetenter Zellen.....	40
2.9.8. Elektroporation von <i>P. aeruginosa</i> .....	41
2.9.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	41
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>43</b>
3.1. Antibiotikaresistenz-Profile klinischer <i>P. aeruginosa</i> -Isolate.....	43
3.2. Analyse der minimalen Inhibierungskonzentration (MIC).....	47
3.2.1. Stabilität der verwendeten Antibiotika .....	47
3.2.2. Antibiotikasensitivität von <i>P. aeruginosa</i> -Harnwegsisolaten in Flüssignährmedium.....	48
3.2.3. Antibiotikasensitivität von <i>P. aeruginosa</i> -Harnwegsisolaten auf Agarnährmedium .....	52
3.3. Zeitabhängigkeit der Wirksamkeit einer Antibiotika-Behandlung .	55
3.4. Sauerstoffabhängigkeit der Antibiotikatoleranz von <i>P. aeruginosa</i>	60
3.5. Antibiotikaresistenz-Mechanismen von <i>P. aeruginosa</i> unter Harnwegs-relevanten Bedingungen .....	62
3.5.1. Wachstumsraten potentiell antibiotikaresistenter <i>P. aeruginosa</i> - Transposonmutanten .....	63
3.5.2. Antibiotikasensitivität von <i>P. aeruginosa</i> -Transposonmutanten in Flüssignährmedium.....	64
3.5.3. Antibiotikasensitivität von <i>P. aeruginosa</i> -Transposonmutanten auf Agarnährmedium .....	66
3.5.4. Abstebeverhalten der <i>P. aeruginosa</i> -Transosonmutanten unter Antibiotika- Einwirkung .....	67
3.5.5. Der Transkriptionsregulator AlgR und sein Einfluss auf Antibiotikaresistenz in <i>P. aeruginosa</i> .....	72
3.5.6. Das Protein SpuE und seine Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> .....	76



3.5.7. Die Fumarase FumC1 und ihr Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von <i>P. aeruginosa</i> .....	77
3.5.8. Der Einfluss von Fumarat im Nährmedium auf die Antibiotikatoleranz der <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante.....	83
3.5.9. Metabolomanalyse der antibiotikaresistenten <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante.....	85
3.5.10. Transkriptomanalyse der antibiotikaresistenten <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante .....	88
3.5.11. Antibiotikatoleranz weiterer <i>P. aeruginosa</i> Transposonmutanten .....	92
3.5.12. Komplementation der antibiotikaresistenten <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante.....	94
3.5.13. Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während der Inkubation von <i>P. aeruginosa</i> mit Antibiotika .....	96
3.5.14. Einfluss des Sauerstoffradikalbildners Menadion auf die <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante .....	101
<b>4. Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>5. Ausblick.....</b>	<b>104</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>118</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>122</b>

## Abkürzungen

2D	zweidimensional
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
AUM	artifiziell es Urin Medium
BTM	Biotrockenmasse
ca.	circa
CF	Cystische Fibrose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FC	<i>fold change</i>
fmet-tRNA	Formylmethionyl-Transfer-RNA
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
H <sub>2</sub> O deion.	deionisiertes Wasser
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galaktosid
Kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheit
kHz	Kilohertz
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
Mb	Megabasenpaare
MIC	minimale Inhibierungskonzentration
min	Minute
mind.	mindestens
MSTFA	Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)

PCR	<i>polymerase chain reaktion</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RIN	<i>RNA-integrity-number</i>
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
s. o.	siehe oben
sRNA	<i>small-RNA</i>
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
(v/v)	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
(w/v)	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein Gram-negatives, chemoorganotrophes Bakterium, das ubiquitär in vielen terrestrischen und aquatischen Habitaten vorkommt. Es gehört zur Familie der *Pseudomonadaceae* und ist der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien zugeordnet (Brock *et al.*, 2006). Das 6,26 Mb große Genom von *P. aeruginosa* PAO1 wurde sequenziert, beinhaltet 5570 annotierte Gene (Stover *et al.*, 2000) und weist einen GC-Gehalt von 66,6 % auf (Stover *et al.*, 2000). Dieses mesophile Stäbchen, das keine Sporen bildet, ist monotrich polar begeißelt (Brock *et al.*, 2006) und verfügt über Typ IV Pili, welche das Bakterium zur „twitching motility“ befähigen und darüber hinaus die Anheftung an biotische und abiotische Oberflächen vermitteln (O'Toole und Kolter, 1998). Sein Stoffwechsel ist sehr vielfältig und es kann unterschiedlichste Verbindungen, wie z. B. Alkohole, Fettsäuren, Zucker, Di- und Tricarbonsäuren, Aromaten, Amine und Aminosäuren als Kohlenstoffquellen nutzen. Dabei sind organische Säuren seine bevorzugten Energiequellen, Glukose wird über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut (Brock *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* kann sowohl aeroben als auch anaeroben Stoffwechsel betreiben und ist in der Lage unter anaeroben Bedingungen Nitrat und Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen (Denitrifikation; Zumft, 1997, Schreiber *et al.*, 2007). Stehen diese nicht zur Verfügung, kann *P. aeruginosa* durch Pyruvat- oder Arginin-Fermentation überleben (Eschbach *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2005). Hierbei ist die Energiegewinnung durch Pyruvat-Fermentation so gering, dass sie *P. aeruginosa* zwar erlaubt zu überleben, ein

Wachstum aber nicht ermöglicht (Schreiber *et al.*, 2007). Die Ansprüche von *P. aeruginosa* an die Kulturbedingungen sind gering. Er ist in der Lage bei Temperaturen bis zu 43 °C zu wachsen. Bei einer optimalen Temperatur von 37 °C beträgt die Generationszeit in Vollmedium ca. 20 min (Brock *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* ist sowohl Oxidase- als auch Katalase positiv. Charakteristisch ist außerdem die Bildung von Pigmenten, wie dem wasserlöslichen Pyoverdin, dem Phenanzinderivat Pyocyanin (Lau *et al.*, 2004) und dem süßlich-aromatisch duftenden Ortho-Aminoacetophenon (Mann, 1966).

Die Tatsache, dass *P. aeruginosa* in Wasser führenden Systemen, vorkommt (Grobe *et al.*, 1995), führt häufig zu hygienischen Problemen in Krankenhäusern (Grobe *et al.*, 1995). Seine opportunistische Humanpathogenität führt bei immungeschwächten Patienten zum Beispiel zu Harnwegsinfekten oder pulmonalen Infektionen, die aufgrund der hohen intrinsischen Antibiotikaresistenzen von *P. aeruginosa* teilweise nur schwer zu bekämpfen sind (Brock *et al.*, 2006). Eine wichtige Eigenschaft von *P. aeruginosa*, die ihm hilft widrige Umstände in seiner Umwelt und während einer Infektion zu überstehen, ist seine Fähigkeit Biofilme zu bilden.

## 1.2. Biofilmbildung

Biofilme sind Ansammlungen von Mikroorganismen, die sich an eine Oberfläche anheften und sich mit einem extrazellulären Schleim umgeben (Mah und O'Toole, 2001a). Dieser besteht zu ca. 98 % aus Wasser (Donlan und Costerton, 2002), das zusammen mit extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) wie Polysacchariden, Proteinen (z. B. extrazellulären Enzymen), Lipiden und Nukleinsäuren (Wingender und Jaeger, 2002) eine schleimige Matrix bildet, in welche die Bakterienzellen eingebettet sind (Costerton *et al.*, 1987). Biofilme sind sehr widerstandsfähig gegenüber Desinfektion und anderen, für planktonisch lebende Zellen schädlichen Einflüssen von außen (Grobe *et al.*, 2001, Schulte, 2003). Die von den Bakterien gebildeten EPS schützen die eingelagerten Zellen z. B. vor Austrocknung, pH-Wert-Schwankungen, Antibiotika (Nickel *et al.*, 1985, Kwon und Lu, 2006) und vor Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems (Donlan und Costerton, 2002).

Die Bildung eines Biofilms lässt sich in fünf Phasen gliedern:

[1] Während der Induktionsphase erfolgt die Primäradhäsion einzelner, planktonisch lebender Zellen an eine Oberfläche (siehe Abbildung 1 Phase 1). Hierbei spielen vor allem Zelloberflächen assoziierte Strukturen, wie Flagellen und Typ IV Pili, aber auch die Zellhülle selbst eine wichtige Rolle (O'Toole und Kolter, 1998). Mit Hilfe des polaren Flagellums schwimmt die Zelle zu einer Oberfläche und es kommt zu einer apikalen Anlagerung, die zunächst reversibel ist (Sauer *et al.*, 2002).

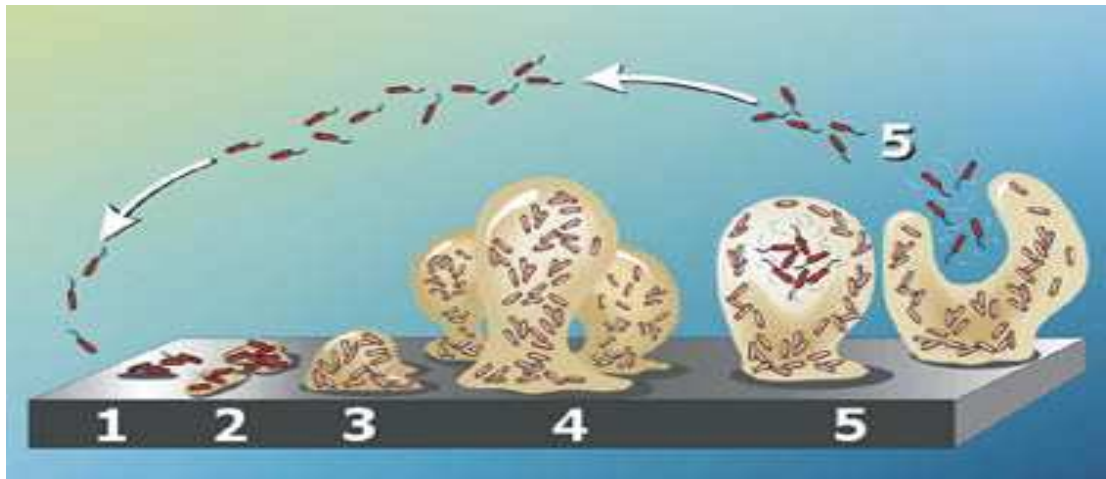
[2] Die darauf folgende Anheftung der Zelle über die gesamte Zelloberfläche in Längsrichtung ist irreversibel (Sauer *et al.*, 2002). Die Zelle beginnt mit der Produktion von EPS und es lagern sich weitere Zellen an dieser Stelle an (siehe Abbildung 1 Phase 2).

[3] In der logarithmischen Wachstumsphase nimmt die Zellmasse stetig zu, die Zellen teilen sich und passen ihre Physiologie und ihren Stoffwechsel an die sessile Lebensweise an (siehe Abbildung 1 Phase 3). Die zunächst nur kleinen Zellaggregate werden durch klonales Wachstum immer größer. Neben Typ IV Pili sind auch EPS für den Zusammenhalt des Biofilms von Bedeutung. Sie werden daher während der Reifung eines Biofilms vermehrt gebildet (O'Toole und Kolter, 1998).

[4] Nach der vollständigen Reifung eines Biofilms tritt dieser in die Plateau-Phase ein, in der die Gesamtzellmasse stagniert. Der Zuwachs neuer Zellen gleicht hier gerade die Ablösung von Zellen aus (siehe Abbildung 1 Phase 4). Die ausgeprägte Struktur und Organisation des Biofilms wird wahrscheinlich über Quorum sensing (QS) reguliert, dessen genaue Mechanismen allerdings noch nicht verstanden sind (Pearson *et al.*, 1997; Davey *et al.*, 2003). Die Zellen eines reifen Biofilms weisen eine veränderte Genexpression auf, wobei Gene, die an der Antibiotikaresistenz der Bakterien beteiligt sind, deutlich stärker exprimiert werden, als bei planktonisch lebenden Zellen (Whiteley *et al.*, 2001).

[5] Die Ablösungsphase wird meist durch Erosion und „sloughing“ verursacht. Dazu kommt es, wenn externe Kräfte, die auf den Biofilm wirken, größer werden als interne,

die ihn zusammen halten. Die Ablösung eines Biofilms hängt folglich von einer Vielzahl physikalischer Faktoren, wie z. B. Viskosität, pH-Wert und Ionenstärke des Mediums, sowie den Strömungsverhältnissen und auferetenden Scherkräften ab (Stoodley *et al.*, 2002). Auch kommt es vor, dass Schwärmzellen aktiv den reifen Biofilm verlassen (siehe Abbildung 1 Phase 5). Diese Schwärmzellen lassen sich an anderer Stelle nieder um einen neuen Biofilm zu bilden (O'Toole und Kolter, 1998).



**Abbildung 1:** Ablauf der Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* (Stoodley *et al.*, 2002).

Der intakte, reife Biofilm ist von kleinen wassergefüllten Kanälen durchzogen, die eine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der zahlreichen Schichten dieses dreidimensionalen Gebildes sicherstellen, und für den Abtransport von Stoffwechselprodukten verantwortlich sind (Costerton *et al.*, 1994). Durch Stoffwechselaktivität der Bakterien entsteht innerhalb des Biofilms ein Gradient von Nährstoffen, Salzen und Sauerstoff, was mikroaerobe bis anaerobe Bedingungen im Inneren des Biofilms zur Folge hat (Ghigo, 2003).

### **1.3. Pathogenität von *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* produziert eine Vielzahl unterschiedlicher zellgebundener und extrazellulärer Virulenzfaktoren und verursacht ein breites Spektrum an Infektionen (Schaber *et al.*, 2004). Der opportunistisch humanpathogene Erreger kann in immunschwachen Patienten beispielsweise zu Infektionen des Mittelohrs, der Bindehaut des Auges, des Respirationstraktes und des Harnwegs führen. CF-Patienten leiden

häufig unter chronischen Lungenentzündungen mit *P. aeruginosa* als dominierendem Keim (Sadikot *et al.*, 2005). Brandopfer, deren Haut großflächige Schäden aufweist, können sich mit *P. aeruginosa* infizieren (Brock *et al.*, 2006). Da sich viele Patienten in Krankenhäusern infizieren, gilt *P. aeruginosa* als einer der wichtigsten nosokomialen Keime, der aufgrund seiner ausgeprägten Antibiotikaresistenzen nur schwer zu therapieren ist (Brock *et al.*, 2006).

Die Virulenz von *P. aeruginosa* ist multifaktoriell. So gehören z. B. Typ IV Pili, Flagellen und Lipopolysaccharide (LPS) zu den zellgebundenen Virulenzfaktoren. Extrazelluläre Virulenzfaktoren werden von den Zellen über sechs verschiedene Sekretionssysteme (Typ I-III-, V-VI- Sekretionssystem und Membranvesikel) in den extrazellulären Raum oder direkt in eine benachbarte Wirtszelle sekretiert (Ma *et al.*, 2003; Filloux *et al.*, 2008). Darunter Exotoxine (Exotoxin A), verschiedene Proteasen, wie Elastasen, Hämolysine, Phospholipasen und Lipasen. Das Exotoxin A (ADP-Ribosyltransferase) hemmt die Proteinbiosynthese in der Wirtszelle (Brock *et al.*, 2006) und konnte in einer Vielzahl von klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten nachgewiesen werden (Plotkowski *et al.*, 2002). Hämolysine, Phospholipasen und Lipasen schädigen die Cytoplasmamembran der Wirtszellen und verursachen Zelllyse (Brock *et al.*, 2006). Durch Enzyme abgebaute Makromoleküle können den Bakterienzellen wiederum als Nährstoffe dienen.

Des Weiteren kann *P. aeruginosa* Pigmente, wie das blau-grüne, chloroformlösliche Pyocyanin und das gelblich fluoreszierende, wasserlösliche Pyoverdin (= Fluoreszein) bilden. Darüber hinaus wird das Exopolysaccharid Alginate produziert. Auch diese drei Virulenzfaktoren werden in den extrazellulären Raum ausgeschleust, wo das Phenanzinderivat Pyocyanin in den umliegenden Zellen durch Auto-Oxidation oxidativen Stress auslöst (Lau *et al.*, 2004). Pyoverdin, welches als Siderophor fungiert, komplexiert dreiwertiges Eisen und stellt es der *P. aeruginosa*-Zelle als zweiwertiges Eisen zur Verfügung. Da viele Habitate innerhalb des menschlichen Körpers Eisenlimitiert sind, herrschen für *P. aeruginosa* während einer Infektion im Wirt oft Eisen-Mangel Bedingungen, die es mit der Bildung von Pyoverdin kompensieren kann (Mittal *et al.*, 2008). Desweiteren besitzt *P. aeruginosa* Häm-Transport-Systeme für die Aufnahme von Häm, welches aus roten Blutkörperchen von Hämolysin freigesetzt wird (Ochsner *et al.*, 2000). Das im Häm enthaltene Eisen kann von *P. aeruginosa*



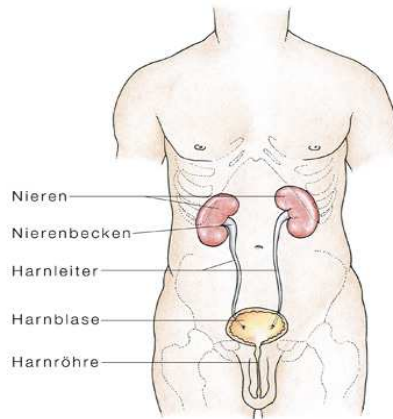
verstoffwechselt werden und stellt eine Eisenquelle bei vorherrschenden Eisenmangelbedingungen dar. Die Bedeutung des Alginats als Virulenzfaktor zeigt sich besonders bei mucoiden *P. aeruginosa*-Stämmen. Dieser Phänotyp wurde vermehrt bei CF-Patienten beobachtet und zeichnet sich durch eine Überproduktion von Alginat aus, welches die Bakterienzellen vor Austrocknung (Schwarzmann und Boring III, 1971), Antibiotika, Desinfektionsmitteln (Rehm und Winkler, 1996) und dem Immunsystem des Wirtes (Pier *et al.*, 2001) schützt. Bei *P. aeruginosa* aus Harnwegsinfektionen konnte dieser Phänotyp allerdings nur bei 1 % der Stämme beobachtet werden (Suman *et al.*, 1993).

Die Kommunikation von *P. aeruginosa*-Zellen untereinander und mit Zellen anderer Spezies findet über verschiedenen Quorum-Sensing (QS)-Systeme statt. Neben den beiden hierarchisch regulierten QS-Systemen LasRI und RhlRI (Latifi *et al.*, 1996), wird auch das *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) zu den QS-Systemen von *P. aeruginosa* gezählt (Diggle *et al.*, 2006). Während die Produktion von PQS Sauerstoff-abhängig ist (Schertzer *et al.*, 2010), werden das LasRI- und das RhlRI-System zelldichteabhängig exprimiert, wobei das LasRI-System die Synthese von RhlRI reguliert (Schuster *et al.*, 2003; Pesci und Igleski, 1999). Diese drei QS-Systeme sind für die Regulation der meisten von *P. aeruginosa* produzierten Virulenzfaktoren verantwortlich (Wilder *et al.*, 2011) und es wurde gezeigt, dass Mutationen innerhalb dieser Systeme die Virulenz und Resistenz von *P. aeruginosa* herabsetzen können (Bottomley *et al.*, 2007; Hentzer *et al.*, 2003). Aus diesem Grund gibt es verschiedene Untersuchungen zur Wirkung von QS-Inhibitoren auf Infektionen mit *P. aeruginosa* (Zhang, 2003; Bjarnsholt *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2005).

## 1.4. Harnwegsinfektionen

Der menschliche Harnweg, in Abbildung 2 dargestellt, führt von den paarig angeordneten, bohnenförmigen Nieren, über die Harnleiter (Ureter) zur Harnblase und von dort durch die Harnröhre (Urethra) nach außen.

In den Nephronen der Nieren werden die Bestandteile des Urins aus dem Blut herausgefiltert und über die Nierenbecken in den Harnleiter abgegeben, welche die Nieren mit der Harnblase verbinden. In der Blase wird der Urin gesammelt, bei einer Füllmenge von 150 ml bis 200 ml tritt Harndrang auf, woraufhin der Urin über die Harnröhre ausgeschieden wird (Manski, 2008).



**Abbildung 2:** Der menschliche Harnweg (<http://www.eesom.com/go/Nieren,+Harnwege/Nieren>).

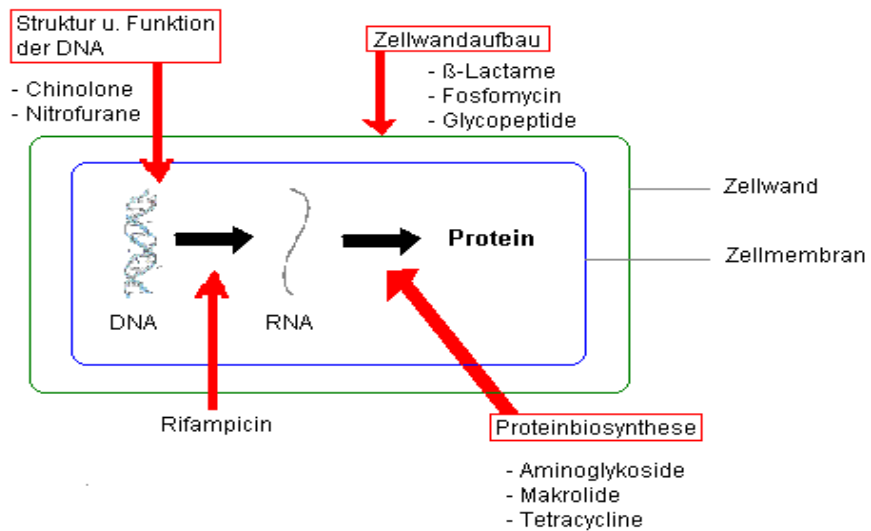
Ein gesunder Erwachsener bildet, abhängig von seinem Alter, Geschlecht, Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme ca. 1 ml Urin pro Minute. Der pH-Wert des Urins variiert in einem Bereich von 4,5 – 8,0 und ist ebenfalls sehr stark abhängig von der Diät der jeweiligen Person (Brooks und Keevil, 1997). Der Urin eines gesunden Menschen setzt sich aus Wasser (95 % des Gesamtvolumens), Harnstoff (Endprodukt des Eiweißstoffwechsels, ca. 20 - 25 g/Tag), Harnsäure (Endprodukt des Purinstoffwechsels, ca. 0,5 - 1,0 g/Tag), Kreatinin (Abbauprodukt aus Muskel- und Nervenzellen, ca 1,2 – 1,8 g/Tag), Aminosäuren (ca. 800 mg/Tag), Salzen (besonders NaCl, ca. 10 g/Tag), Phosphaten und organischen Säuren, wie Oxalsäure und Zitronensäure zusammen (Manski, 2008; Pschyrembel, 2004). Stickstoffhaltige Urochrome, die während des Abbaus von Eiweißen und Bilirubin entstehen, geben dem gesunden Urin seine gelbliche Farbe (Thudichum, 1864). Während die Ausscheidung geringer Mengen Zucker (weniger als 200 mg pro Tag) über den Urin normal ist, können höhere Konzentrationen ein Zeichen für Diabetes mellitus sein. Auch bakterielle Harnwegsinfektionen lassen sich über eine veränderte Zusammensetzung des Urins detektieren. Hierbei erhöht sich der Proteingehalt des Urins und es sind Leukozyten und

Erythrozyten darin zu finden (Pschyrembel, 2004). Des Weiteren wird von den besiedelnden Bakterien das in geringen Mengen im Urin vorhandene Nitrat (0,5 – 2 mM) zu Nitrit abgebaut, welches im Urin eines gesunden Menschen nicht vorkommt (Manski, 2008). Auch der O<sub>2</sub>-Gehalt des Urins verändert sich während einer Bakteriellen Infektion. Es wurde bereits 1997 gezeigt, dass der Urin von Patienten, die an einer Harnwegsinfektion leiden, weniger Sauerstoff enthält als der eines gesunden Menschen (Giannakopoulos *et al.*, 1997). Ereignen sich akute oder chronische Entzündungsprozesse im Bereich der Nieren und/oder der ableitenden Harnwege, so spricht man von einer Harnwegsinfektion (Manski, 2008). Harnwegsinfektionen und Entzündungen des Urogenitaltraktes gehören zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen (Manski, 2008). Sie werden meistens durch Bakterien, seltener durch Pilze oder Viren hervorgerufen (Manski, 2008). Im gesunden Organismus werden Erreger, die über die Urethra in die Harnblase eindringen, bei ihrer Entleerung wieder hinausgespült. Ist der restlose Abfluss des Urins allerdings behindert, so kann es zu einer Entzündung der Harnblase (Zystitis) kommen. Steigen diese Erreger aus der Infektion der unteren Harnwege über die Harnleiter bis zum Nierenbecken auf, spricht man von einer Infektion der oberen Harnwege. Bei einer Harnwegsinfektion befinden sich mehr als  $1 \times 10^5$  Keime pro ml im Urin der betroffenen Person, wobei die auslösenden Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* (60 %), *Proteus* (15 %), *Klebsiella* (10 %) und *Streptococcus faecalis* (10 %) meist zur normalen Darmflora gehören (Manski, 2008). In 12 % der Fälle ist *P. aeruginosa* an einer Harnwegsinfektion beteiligt (Manski, 2008). Besonders gefährdet sind Patienten mit einem gestörten Abfluss des Urins aus der Blase, Immungeschwächte, Schwangere und Patienten mit Diabetes mellitus (Manski, 2008). Bei Patienten die mit einem Katheter behandelt werden steigt das Risiko einer Harnwegsinfektion mit der Dauer der Katheterisierung. Während das Infektionsrisiko bei der Verwendung eines Kurzzeit-Katheters (bis zu sieben Tage) bei 10 – 50 % liegt, erleiden nahezu alle Patienten eine Infektion wenn sie mit einem Langzeit-Katheter (über 28 Tage) behandelt werden (Stickler, 1996). *P. aeruginosa* ist dabei an etwa 35 % der Katheter assoziierten Harnwegsinfektionen beteiligt (Mittal *et al.*, 2009). Dabei liegt die Sterblichkeitsrate der Patienten, die mit multiresistenten *P. aeruginosa*-Stämmen infiziert sind bei bis zu 67 %, während sie bei nicht resistenten Stämmen immerhin 23 % beträgt (Obritsch *et al.*, 2005). Als multiresistent werden per Definition *P. aeruginosa* Stämme eingestuft, die Resistenzen gegen mindestens drei antipseudomonadale Antibiotika, wie antipseudomonadale  $\beta$ -Lactame (z. B.

Piperacillin, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem und Azteonam), Fluorchinolone (z. B. Ciprofloxacin) und die Aminoglykoside Gentamycin, Tobramycin und Amikazin aufweisen (Defez *et al.*, 2004).

## 1.5. Antibiotika

Antibiotika sind Substanzen, die von bestimmten Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden, und schon in geringen Konzentrationen gegen andere Mikroorganismen wirksam sind (Brock *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu stehen Chemotherapeutika, die synthetisch hergestellt werden. Von den vielen bisher entdeckten Antibiotika haben nur weniger als ein Prozent eine Bedeutung in der medizinischen Behandlung bakterieller Infektionen (Brock *et al.*, 2006). Antibiotika können das Wachstum von Bakterien hemmen (bakteriostatische Wirkung), sie abtöten (bakteriozide Wirkung) oder die Bakterienzellen auflösen (bakteriolytische Wirkung) (Brock *et al.*, 2006). Aufgrund ihrer chemischen Struktur und ihrer Wirkungsweise werden Antibiotika in unterschiedliche Klassen eingeteilt. In Abbildung 3 sind einige der wichtigsten Antibiotika-Klassen und ihre Wirkorte innerhalb einer Bakterienzelle dargestellt. Während  $\beta$ -Lactamantibiotika, Fosfomycin und Glycopeptide beispielsweise den Zellwandaufbau inhibieren, schädigen Chinolone und Nitrofurane die Struktur und Funktion der DNA. Auch Translation (z. B. Rifampizin) und Transkription (z. B. Aminoglykoside, Makrolide und Tetracycline) der bakteriellen Zelle sind wichtige Angriffsorte für Antibiotika. Da durch die Einnahme von antibiotischen Medikamenten der Patient möglichst nicht geschädigt werden soll, gilt hier das „Prinzip der selektiven Toxizität“. Antibiotika wirken also speziell auf Strukturen und Vorgänge der prokaryotischen Bakterienzelle, die in einer eukaryotischen Zelle fehlen oder anders aufgebaut sind. Diese speziellen Angriffspunkte sind beispielsweise die Zellwand, die Struktur und Funktion der Zellmembran, die Proteinbiosynthese und die DNA-Replikation (Brock *et al.*, 2006). Im Folgenden wird die Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika vorgestellt.



**Abbildung 3:** Wirkorte verschiedener Antibiotika in einer prokaryotischen Zelle.

Tobramycin ( $C_{18}H_{37}N_5O_9$ ) gehört zur Klasse der Aminoglykosid-Antibiotika, welche aus glykosidisch gebundenen Aminosuktern bestehen. Sie binden irreversibel und spezifisch an Proteine der 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und verdrängen dort die Formylmethionyl-Transfer-RNA (fmet-tRNA) von den Ribosomen-Bindungsstellen. Sie verhindern damit, dass sich Initiationskomplexe bilden können, die die Proteinbiosynthese einleiten. Des Weiteren bewirken Aminoglykoside ein fehlerhaftes Ablesen der mRNA-Kodons und das Auseinanderbrechen funktionell wichtiger Polysomen (mehrere Ribosomen, die sich zur Proteinsynthese in Tandems an ein einzelnes mRNA-Molekül heften) in funktionslose Monosomen (Mims *et al.*, 2006). Durch diese Mechanismen kommt die Proteinbiosynthese der betroffenen Zellen zum Erliegen und ihr Stoffwechsel wird gehemmt. Die Zelle stirbt jedoch nicht ab, Aminoglykoside wirken daher bakteriostatisch (Brock *et al.*, 2006).

Das Grundgerüst der Chinolone ist aus Chinoloncarbonsäure aufgebaut. Fluorchinolone, zu denen auch das hier verwendete Ciprofloxacin ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ) gehört, liegen substituiert mit Fluor vor. Als Gyrasehemmer sorgen Chinolone dafür, dass die bakterielle Gyrase, die zur Proteinfamilie der Topoisomerasen gehört, ihre Aufgabe nicht korrekt ausführen kann (Brock *et al.*, 2006). Die bakterielle Gyrase (Topoisomerase II) sorgt in der Zelle für das so genannte „supercoiling“ der DNA, diese wird während der Replikation so gefaltet und verdrillt, dass sie in die Bakterienzelle hinein passt. Ciprofloxacin bindet irreversibel an den DNA-Enzym-Komplex, nachdem

die Gyrase einen Doppelstrangbruch in den DNA-Strang eingeführt hat. So wird die sofortige Reparatur dieses Doppelstrangbruches verhindert. Die Anzahl der Doppelstrangbrüche in der Zelle erhöht sich und die Zelle stirbt letztendlich bei dem Versuch, mittels SOS-Antwort die zahlreichen Doppelstrangbrüche wieder zu schließen (Mims *et al.*, 2006). Fluorchinolone gehören zu den vollständig synthetisch hergestellten Antibiotika, es handelt sich daher genau genommen um ein Chemotherapeutikum.

Tobramycin und Ciprofloxacin wurden für die Verwendung in dieser Arbeit ausgewählt, da sie aktuell in der Medizin gegen komplizierte Harnwegsinfektionen mit Beteiligung von *P. aeruginosa* verabreicht werden.

Neuere Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass neben diesen Zielstruktur-spezifischen Wirkmechanismen der verschiedenen Antibiotikaklassen, alle bakterioziden Antibiotika die Zelle zusätzlich durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies schädigen. Kohanski *et al.*, 2007, Dwyer *et al.*, 2009). Kohanski und Kollegen zeigten mit Hilfe von Mutanten-Studien, dass die Interaktion von bakterioziden Antibiotika mit ihren spezifischen Zielstrukturen innerhalb der Bakterienzelle die Oxidation von Reduktionsequivalenten wie NADH über die Elektronentransportkette stimuliert. Diese Hyperaktivität der Elektronentransportkette, die von der Aktivierung des Zitratzyklus abhängig ist, stimuliert laut Kohanski *et al.* die Bildung von Superoxiden Kohanski *et al.*, 2007. Diese wiederum entziehen Eisen-Schwefel-Zentren das Eisen, welches über die Fenton-Reaktion die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fördert Kohanski *et al.*, 2007. Die in der Fenton-Reaktion übermäßig gebildeten Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) schädigen neben der DNA auch Proteine und Lipide, was schließlich zum Tod der Zelle führt Kohanski *et al.*, 2007. Ein weiterer Hinweis auf diese Zusammenhänge ist die Tatsache, dass in Transkriptomanalysen unter Antibiotikaeinfluss viele Gene hochreguliert sind, die der DNA-Reparatur und der Verteidigung gegen oxidativen Stress dienen (Yeom *et al.*, 2010). Außerdem zeigten Yeom *et al.* die Eisenabhängigkeit der antibiotischen Wirkung verschiedener Antibiotika (Yeom *et al.*, 2010).

## 1.6. Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa*

Bei vielen *P. aeruginosa*-Infektionen handelt es sich um chronische Erkrankungen oder nosokomiale Infektionen, die nur schwer zu behandeln sind. Aufgrund seiner großen Anpassungsfähigkeit und seiner hohen intrinsischen Antibiotikaresistenz ist *P. aeruginosa* nur schlecht mit Antibiotika zu behandeln (Brock *et al.*, 2006). Zudem ist *P. aeruginosa* dazu fähig, während einer Antibiotikabehandlung weitere Antibiotikaresistenzen zu erlangen. Diese außerordentlich hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber den verschiedensten Antibiotika-Klassen verdankt *P. aeruginosa* einer Kombination aus mehreren Faktoren.

Zum einen begrenzt die geringe Permeabilität der äußeren Membran des Gram-negativen Bakteriums das Eindringen kleiner hydrophiler Moleküle in die Zelle und schließt größere Moleküle aus (Brock *et al.*, 2006). Die Membranpermeabilität von *P. aeruginosa* ist ca. 100-fach geringer, als die von *E. coli* (Nakae, 1986). Die kleineren, hydrophilen Antibiotika, wie z.B. Chinolone durchqueren die äußere Membran durch Porin-Proteine (z.B. OprD und OprG), die die Membran durchspannen. Mutationen dieser Porin-Proteine, verhindern das Eindringen solcher Antibiotika und haben eine erhöhte Resistenz der Mutante zur Folge (Brock *et al.*, 2006; Quale *et al.*, 2006). Zum anderen verfügt *P. aeruginosa* über so genannte „multidrug“ Efflux-Pumpen, die unter Energie-Verbrauch Antibiotika aus der Zelle heraus pumpen und somit aus dem Cytosol entfernen. Diese Protein-Komplexe beinhalten eine energieabhängige Pumpe, die sich in der Cytoplasmamembran befindet und über ein Linkerprotein mit einem Porin der äußeren Membran verbunden ist (Brock *et al.*, 2006). Für *P. aeruginosa* sind einige verschiedene Efflux-Systeme beschrieben und alle Antibiotika-Klassen, bis auf die Polymyxine, werden von einem oder mehreren Efflux-Systemen erfasst (Brock *et al.*, 2006). Während der MultieffluxAB-outer-membrane-ProteinM-Komplex (MexAB-OprM)  $\beta$ -Lactame, Chinolone, Penicilline, Cephalosporine und eine Reihe von Desinfektionsmitteln aus der Zelle hinaus befördert, schleust MexXY-OprM unter anderem Aminoglykoside in den extrazellulären Raum (Brock *et al.*, 2006). MexXY-OprN, welches mit dem äußeren Membranprotein OprD koreguliert ist, führt zu einer ganzen Reihe von Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika-Klassen, unter anderem Imipenem, Meropenem, einige Chinolone, Penicilline und Cephalosporine (Bonomo

und Szabo, 2006). Auch die MexEF-OprN und MexCD-OprJ Komplexe gehören zu diesen „multidrug“ Efflux-Pumpen (Quale *et al.*, 2006).

Neben diesen Abwehrmechanismen verfügt *P. aeruginosa* über chromosomal kodierte Resistenzgene für die Degradation einiger Antibiotika. Ein Beispiel hierfür ist das *ampC*-Gen, welches für eine  $\beta$ -Lactamase kodiert, die den  $\beta$ -Lactamring, den alle  $\beta$ -Lactamantibiotika gemeinsam haben, hydrolysiert (Livermore, 1995). Aminoglykoside werden von einigen *P. aeruginosa*-Stämmen ebenfalls modifiziert und damit unwirksam gemacht, indem Enzyme Acetyl-, Phosphat- oder Adenylyl-Gruppen auf Amino- und Hydroxyl-Substituenten am Antibiotika-Molekül übertragen werden (Lambert *et al.*, 2002).

Ein weiterer Resistenz-Mechanismus besteht in einer mutagenen Veränderung des Angriffsortes des Antibiotikums. Die verbreitetste Veränderung in *P. aeruginosa* findet an der A-Untereinheit der DNA-Gyrase statt, welche das Ziel der Chinolone ist. Das Enzym ist daraufhin weiterhin aktiv aber aufgrund der Veränderung ist die Bindung des Chinolons hier nicht mehr möglich. Außerdem sind in *P. aeruginosa* ähnliche strukturelle Veränderungen der 30S Untereinheit der Ribosomen bekannt, die diese vor der Wirkung der Aminoglykoside schützen (Lambert *et al.*, 2002).

Innerhalb eines Biofilms spielen neben den bereits erwähnten Resistenz-Mechanismen offenbar noch andere Vorgänge eine Rolle, da *P. aeruginosa* in Biofilmen wesentlich toleranter ist, als planktonisch lebende Zellen (Mah und O'Toole, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* Zellen innerhalb eines Biofilms eine 10- bis 1000-fach erhöhte Antibiotikaresistenz aufweisen, verglichen mit planktonisch lebenden Zellen (Hoyle und Costerton, 1991). Die Mechanismen dieser erhöhten Antibiotikatoleranz im Biofilm sind noch nicht vollständig geklärt, könnten aber mit der höheren Zelldichte, einer erhöhten Alginat-Produktion und weiteren EPS-Bestandteilen zu tun haben (Mah und O'Toole, 2001). Es wurde gezeigt, dass die Diffusion verschiedener Antibiotika durch einen Biofilm hindurch nur eingeschränkt möglich ist und dass positiv geladene Aminoglykoside beispielsweise an die negativ geladenen Alginatmoleküle binden können (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988). Diese Diffusionsbarriere verringert die Antibiotikakonzentration in den unteren Schichten eines Biofilms erheblich und führt hier zu einem verbesserten Überleben der *P. aeruginosa*



Zellen (Mah und O'Toole, 2001c). Desweiteren führt das Biofilmwachstum zu einer veränderten Physiologie der Zellen, deren langsamer wachsender Phänotyp mit Zellen der Stationärphase zu vergleichen ist, was die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika verringert, die besonders proliferierende Zellen schädigen (Borriello *et al.*, 2006). Auch die mikroaeroben Bedingungen, die in den unteren Schichten eines Biofilms vorherrschen, tragen zu dessen erhöhter Antibiotikatoleranz bei (Boriello *et al.*, 2004). Die enorme Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* einerseits und der unbedachte Umgang mit Antibiotika andererseits bringen immer neue multi-resistente Stämme hervor.

## 1.7. Zielsetzung

*P. aeruginosa* ist ein nosokomialer Keim, der aufgrund seiner hohen intrinsischen Antibiotikaresistenz und seiner großen Anpassungsfähigkeit ein medizinisch relevantes Problem darstellt. Wenig verstanden waren dabei bisher Infektionen des Urogenitaltraktes durch *P. aeruginosa*.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Antibiotika-Resistenzmechanismen von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu charakterisieren. Hierzu sollten zunächst Resistenzprofile von 32 *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten aus einer Klinik und einer Privatpraxis für Urologie erstellt werden. Im Fokus des Interesses standen während dieser Arbeit die speziellen Bedingungen, die während einer Harnwegsinfektion von den Bakterien vorgefunden werden, und deren Auswirkungen auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa*. Insbesondere der Einfluss des Nährstoffangebotes und der Wachstumsphase auf die Antibiotikaresistenz spielten hierbei eine große Rolle. Außerdem sollten die physiologischen Auswirkungen des Biofilmwachstums und der Sauerstofflimitierung im Harnweg berücksichtigt werden.

Resistenzmechanismen sollten anhand von *P. aeruginosa*-Mutanten gegen zwei klinisch relevante Antibiotika (Tobramycin und Ciprofloxacin) genauer untersucht werden. Neben Transkriptomanalysen sollten zur Aufklärung dieser Mechanismen auch Metabolomanalysen durchgeführt werden. Desweiteren sollte die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Wirkung von Antibiotika unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen näher charakterisiert werden.

Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* unter Infektions-relevanten Bedingungen im menschlichen Harnweg geben und bisher wenig beschriebene Resistenzmechanismen von *P. aeruginosa* identifizieren und aufklären helfen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterial

- Sterilfilter: Celluloseacetat, Porendurchmesser: 0,2  $\mu\text{m}$ , Sarstedt AG, Nümbrecht
- Membranfilter: Polycarbonat, Porendurchmesser: 0,22  $\mu\text{m}$ , Durchmesser: 2,5 cm, GV Millipore, Eschborn
- Faltenfilter: Filtrierpapier, Durchmesser: 185 mm, Macherey-Nagel, Düren
- Mikrotiterplatten: 96 Well, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Gas-permeable Membran: Breathe-easy, Roth, Karlsruhe
- Antibiotika-Testblättchen, Durchmesser: 9 mm, Macherey-Nagel, Düren

#### 2.1.2. Kits

- Antibiotikaresistenztests: ATB<sup>TM</sup>PSE1, bioMérieux, Nürtingen
- RNA Protect<sup>®</sup> Bacteria Reagent Kit, Quiagen, Hilden
- RNeasy Mini Kit, Quiagen, Hilden
- Procaryote Total RNA Nano Chips, Agilent, Santa Clara, USA
- Oligonukleotid Microarrays: Custom designed, Agilent, Santa Clara, USA
- RNA Labeling Kit: USL Fluorescent labeling Kit für Agilent Arrays (Dual Labeling), Kreatech, Amsterdam, Niederlande

#### 2.1.3. Enzyme

- Restriktionsenzyme: *SacI*-HF, *KpnI*-HF, New England Biolabs, Frankfurt
- DNA-Ligase: T4 DNA-Ligase, New England Biolabs, Frankfurt
- DNA Polymerasen: Phusion, Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Espoo, Finnland  
Taq, New England Biolabs, Frankfurt

## 2.1.4. Geräte

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte, deren Modellbezeichnung nebst Hersteller und Firmensitz.

Gerät	Modell	Hersteller, Firmensitz
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen
Agarosegel-Dokumentation	DeVision DBOX	DeconDC Science Tec, Hohengandern
Autoklav	FVA3/A1	Fedegari Autoklaven AG, Bedano (CH)
Bioanalyzer	Bioanalyzer 2100	Agilent, Santa Clara (USA)
Brutschrank	BE 400	Memmert, Schwabach
Luminometer	Biocounter M2010	Lumac, Niederlande
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Model 680	Biorad, München
Microarray Scanner	High-Resolution C Scanner	Agilent, Waldbronn
pH-Messgerät	pH211 Microprocessor	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore, Eschborn
Schüttelbad	Type AT15	Infors AG, Bottmingen (CH)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vakuumkonzentrator	Concetrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waagen	Feinwaage Sartorius Typ: 2472	Sartorius, Göttingen
	Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C12 Thermoboy	mgw LAUDA, Königshofen
Zentrifugen	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

### 2.1.5. Chemikalien

- Antibiotika: Tobramycin, Best.-Nr.: T4014, Sigma-Aldrich, München  
Ciprofloxacin, Best.-Nr.: 17850, Fluka, Oberhaching  
Tetracyclin-Hydrochlorid, Best.-Nr.: 0237.2, Roth, Karlsruhe  
Gentamicinsulfat, Best.-Nr.: 02334, Roth, Karlsruhe
- Molekulargewicht-Standards für Agarosegelelektrophorese: 1 kb DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot
- Uronsäurebestimmung: di-Natriumtetraborat-Decahydrat, Fluka, Oberhaching  
3-Hydroxybiphenyl, Fluka, Oberhaching
- Chemolumineszenz-Messung: Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion), Roth, Karlsruhe
- Menadion-Sodium-Bisulfit, Sigma-Aldrich, München
- ATB-Medium, bioMérieux, Nürtingen
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Sigma-Aldrich, München

Alle Chemikalien und Reagenzien, die hier nicht explizit Erwähnung finden, wurden im benötigten Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Difco, Fluka, Merck, Riedel-de-Häen, Serva oder Sigma.

## 2.2. Puffer und Lösungen

### 2.2.1. Lösungen zur Bestimmung von Uronsäuren

#### **Lösung 1 (12,5 mM Tetraborat)**

0,9535 g di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Fluka, Oberhaching) wurden in 200 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst.

#### **Lösung 2 (0,15 % (w/v) 3-Hydroxybiphenyl)**

15 mg 3-Hydroxybiphenyl (Fluka, Oberhaching) wurden in 10 ml 0,5 % (w/v) NaOH gelöst.

### **Standard**

0 – 200 µg gereinigtes Bakterienalginat von *P. aeruginosa* FRD1 in 1 ml H<sub>2</sub>O deion.

### **2.2.2. Antibiotika-Stammlösungen**

#### **Tobramycin (40 mg/ml)**

400 mg Tobramycin (Sigma-Aldrich, München) wurden in 10 ml Milli-Q Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C nicht länger als eine Woche gelagert

#### **Ciprofloxacin (2 mg/ml)**

20 mg Ciprofloxacin (Fluka, Oberhaching) wurden in 10 ml Milli-Q Wasser gelöst und mit 1 M NaOH auf pH 11 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C nicht länger als eine Woche gelagert.

#### **Tetracyclin (10 mg/ml)**

100 mg Tetracyclin-Hydrochlorid (Roth, Karlsruhe) wurden in 10 ml Milli-Q Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C nicht länger als eine Woche gelagert.

#### **Gentamicin (50 mg/ml)**

50 mg Gentamicinsulfat (Roth, Karlsruhe) wurden in 1 ml Milli-Q Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C nicht länger als eine Woche gelagert.

### **2.2.3. PBS-Puffer**

80 g/l	NaCl
2 g/l	KCl

26,8 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
2,4 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ deion., pH 7,4	

Der PBS-Puffer wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

#### 2.2.4. TAE-Puffer

40 mM	Tris
1 mM	EDTA
ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ deion., pH 8,5	

Nach dem Lösen aller Bestandteile in  $\text{H}_2\text{O}$  deion. wurde der pH-Wert mit konz. Essigsäure auf 8,5 eingestellt.

#### 2.2.5. TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA
ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ deion., pH 8,0	

Nach dem Lösen aller Bestandteile in  $\text{H}_2\text{O}$  deion. wurde der pH-Wert mit konz. Essigsäure auf 8,5 eingestellt.

#### 2.2.6. Plasmid-Minipräparationslösungen

##### P1-Lösung

50 mM	Glucose
10 mM	EDTA
25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,1 mg/ml	RNase (wird frisch zugesetzt)

**P2-Lösung** (immer frisch anzusetzen)

1 % (w/v)	SDS
200 mM	NaOH

**P3-Lösung**

3 M	Natrium-Acetat, pH 5,5
-----	------------------------

Alle drei Lösungen wurden in H<sub>2</sub>O deion. angesetzt.

## 2.3. Nährmedien

### 2.3.1. LB-Medium

Als Vollmedium wurde LB-Medium (Luria Broth) verwendet. Zur Herstellung von LB-Agar wurden 15 g/l Agar (Hellmuth Carroux GmbH) zugesetzt. Alle Ingredienzien wurden in H<sub>2</sub>O deion. gelöst und das Agar-Nährmedium nach dem Autoklavieren zu je 20 ml in Petrischalen gegossen.

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl
ad 1 l H <sub>2</sub> O deion.	

Für einige Untersuchungen wurde das LB-Medium 1:10 in H<sub>2</sub>O deion. verdünnt verwendet. Die Agarkonzentration von 15 g/l wurde hierbei nicht variiert.

Für Teile dieser Arbeit wurde kommerzielles Fertigmedium der Firma Sigma verwendet.

2,5 g/l	Luria Broth (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim)
ad 1 l H <sub>2</sub> O deion.	



### 2.3.2. 1:10 LB-Eisenmangelmedium

Für Experimente, den Einfluss von Eisen auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* betreffend, wurde ein Eisenmangelmedium auf Basis des 1:10 LB-Mediums hergestellt. Hierzu wurden 2,5 g/l Luria Broth (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim) in H<sub>2</sub>O deion. gelöst und für 1 h mit 50 g/l Chelex (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert (Faltenfilter, Durchmesser: 185 mm, Macherey-Nagel, Düren) und zur Sterilisation autoklaviert. Da Chelex dem Medium neben Eisen auch alle anderen Übergangsmetalle entzieht wurden dem Medium nach der Chelex-Behandlung folgende sterile Komponenten wieder zugesetzt:

1 ml/l	Spurenelementelösung	
100 µl/l	1 M CaCl <sub>2</sub>	
1 ml/l	1 M MgCl <sub>2</sub>	
Spurenelementelösung:	200 mg/l	CaSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	200 mg/l	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	20 mg/l	MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O
	20 mg/l	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	20 mg/l	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	10 mg/l	NaMoO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O
	5 mg/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

### 2.3.3. Artifizielles Urin Medium (AUM)

Für Experimente unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen wurde ein artifizielles Urin Medium (AUM, nach Brooks und Keevil, 1997) verwendet, dessen Zusammensetzung dem menschlichen Urin entspricht.

Die Komponenten der Lösungen 1, 2 und 3 wurden hierfür getrennt voneinander in H<sub>2</sub>O deion. gelöst und die pH-Werte der Lösungen 1 und 3 auf 6,5 eingestellt. Der pH-Wert der Lösung 2 wurde zunächst mit konzentrierter HCl auf pH 2 abgesenkt, um die Salze zu lösen. Anschließend wurde auch der pH-Wert dieser Lösung auf 6,5 eingestellt. Vor

dem Sterilfiltrieren wurde zuerst Lösung 3 zu Lösung 1 gegeben, bevor Lösung 2 hinzugefügt werden konnte. Um Agarnährmedium herzustellen wurden alle Lösungen doppelt-konzentriert angesetzt und 1:2 mit autoklaviertem 3 % (w/v) Agar in H<sub>2</sub>O deion. versetzt.

Lösung 1:

1,0 g/l	Trypton (Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut)
5 mg/l	Hefeextrakt
0,1 g/l	Milchsäure
0,4 g/l	Zitronensäure
10,0 g/l	Harnstoff
70 mg/l	Harnsäure
0,8 g/l	Kreatinin
5,2 g/l	Natriumchlorid
1,2 mg/l	Eisen(II)sulfat x 7 H <sub>2</sub> O
0,49 g/l	Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O
1,4 g/l	Natriumsulfat
1,3 g/l	Ammoniumchlorid

Lösung 2:

0,37 g/l	Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O
2,1 g/l	Natriumhydrogencarbonat

Lösung 3:

0,95 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat
1,2 g/l	di-Kaliumhydrogenphosphat

ad 1 l H<sub>2</sub>O deion., pH 6,5

## 2.4. Verwendete Bakterien-Stämme, Plasmide und Primer

**Tabelle 2:** Beschreibung verwendeter Bakterien-Stämme und Transposonmutanten nebst Referenz.

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>E. coli</i> -Stämme:		
DH10B	F- <i>araD139 Δ(ara,leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR ϕ80dlacZΔM15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>P. aeruginosa</i> -Stämme:		
PAO1	Laborstamm	Dunn & Holloway, 1971
PAO1Δ <i>fumC1</i>	PAO1 Transposonmutante, Transposon in <i>fumC1</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1Δ <i>algR</i>	PAO1 Transposonmutante , Transposon in <i>algR</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1Δ <i>spuE</i>	PAO1 Transposonmutante , Transposon in <i>spuE</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1Δ <i>sodM</i>	PAO1 Transposonmutante , Transposon in <i>sodM</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1ΔPA4467	PAO1 Transposonmutante , Transposon in PA4467	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1ΔPA4469	PAO1 Transposonmutante , Transposon in PA4469	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1ΔPA4471	PAO1 Transposonmutante , Transposon in PA4471	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
PAO1 + pBBR1MCS5	PAO1 Wildtyp mit pBBR1MCS5-Vektor	diese Arbeit
PAO1Δ <i>fumC1</i> + pBBR1MCS5:: <i>fumC1</i>	PAO1Δ <i>fumC1</i> Transposonmutante mit pBBR1MCS5-Vektor, der das <i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>fumC1</i> -Gen enthielt	diese Arbeit

**Tabelle 3:** Beschreibung verwendeter klinischer *P. aeruginosa*-Isolate aus Harnwegsinfektionen. Die *P. aeruginosa*-Isolate von Dr. M. Hogardt stammen aus der Klinik Großhadern in München (K), die von Dr. R. Neubauer stammen aus einer Privatpraxis in Kassel (P). MSU= Mittelstrahlurin

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
MH05	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH06	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH07	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH08	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH09	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
RN12	Isolat aus MSU (K)	Dr. R. Neubauer
RN13	Isolat aus MSU (P)	Dr. R. Neubauer
RN14	Isolat aus MSU (P)	Dr. R. Neubauer
MH15	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH16	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH17	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH18	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch)	Dr. M. Hogardt
MH19	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH20	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch)	Dr. M. Hogardt
RN21	Isolat aus MSU (P)	Dr. R. Neubauer
MH25	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch), Folgeisolat von MH18	Dr. M. Hogardt
MH26	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH27	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch)	Dr. M. Hogardt
MH28	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH29	Isolat aus MSU	Dr. M. Hogardt
MH30	Isolat aus Katheter-Urin (chronisch), Folgeisolat von MH27	Dr. M. Hogardt
MH33	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH34	Isolat aus Katheter-Urin/Fistel (chronisch)	Dr. M. Hogardt
MH35	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH36	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH37	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH38	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH39	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MH54	Isolat aus Katheter-Urin	Dr. M. Hogardt
MS55	„Small colony variant“ Variante von RN21	Marie Sauer
MH56	Folgeisolat von MH34 (chronisch)	Dr. M. Hogardt
MH57	Folgeisolat von MH34 (chronisch)	Dr. M. Hogardt

**Tabelle 4:** Beschreibung der verwendeten Plasmide mit Referenz.

Vektor	Beschreibung	Referenz/Quelle
pBBR1MCS5	<i>lacZ</i> $\alpha$ , P <sub>lac</sub> ; P <sub>t7</sub> , Gm <sup>r</sup> , mob	Kovach <i>et al.</i> , 1994 und 1995
pBBR1MCS5:: <i>fumC1</i>	<i>lacZ</i> $\alpha$ , P <sub>lac</sub> ; P <sub>t7</sub> , Gm <sup>r</sup> , mob, <i>fumC1</i> -Gen aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1	diese Arbeit

**Tabelle 5:** Beschreibung der verwendeten Primer mit Sequenz.

Primer	Sequenz
oPT36	GGG GTA CCT TTT CGT TTC CGC CTG TT
oPT37	CGA GCT CCA TGG CGG TAC CTC CAG TG
fumC1_forw	ACT TCA TGC AGC ATT TCC CGG TGG AT

## 2.5. Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1. Stammhaltung und Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wurden 1700  $\mu$ l einer bis in die Stationärphase kultivierten Bakterienkultur in LB-Medium (ü. N., 37 °C, 200 rpm), mit 300  $\mu$ l 100 %igem (v/v) Glycerin intensiv gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte die Einlagerung der Kulturen bei -80 °C.

### 2.5.2. Photometrische Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurde für eine OD<sub>578 nm</sub> von 1,0 eine Zelldichte von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml angenommen.

### 2.5.3. Anzucht von LB-Vorkulturen

Um für alle Versuche standardisierte Bedingungen zu schaffen und die *P. aeruginosa*-Kulturen zu synchronisieren, wurden 24 h vor Beginn der jeweiligen Experimente Vorkulturen angesetzt. Dazu wurden 5 ml steriles LB-Medium in ein steriles Reagenzglas pipettiert und aus der entsprechenden Kryokultur (Kapitel 2.5.1) beimpft. Die Vorkulturen wurden bei 37 °C über Nacht (ü. N.) mit 200 rpm geschüttelt.

### 2.5.4. Anzucht von Membranfilter-Biofilmen

Zur Anzucht von Biofilmen wurden *P. aeruginosa*-Zellen auf Polycarbonat-Membranfiltern ( $\varnothing = 2,5$  cm; Porendurchmesser = 0,22  $\mu\text{m}$ ; Millipore, Eschborn) angezogen. Hierzu wurden je 50  $\mu\text{l}$  einer 1 : 2500 mit 0,9 % (w/v) NaCl verdünnten LB-Vorkultur (ü. N., 200 rpm, 37 °C,  $\text{OD}_{578\text{ nm}}$  von 5,0) auf Membranfiltern zu einem Biofilm ausplattiert, während diese auf sterilem Whatmanpapier gebettet waren. Die so beimpften Filter wurden für  $24\text{ h} \pm 0,2\text{ h}$  auf Nähr-Agar gelegt und bei 37 °C aerob inkubiert. Für anaerobe Kultivierungen wurden dem Agar-Nährmedium 50 mM  $\text{KNO}_3$  zugesetzt und die Inkubationszeit auf 3 Tage (1:10 LB), bzw. 4 Tage (AUM) verlängert, hierbei wurden die Filterbiofilme alle 24 h auf frisches Agar-Nährmedium transferiert.

### 2.5.5. KBE-Bestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) eines Biofilms auf einem Membranfilter wurden die Filter in 1 ml 0,9 % (w/v) NaCl in einem sterilen Reaktionsgefäß geschüttelt, um die Biofilme vom Filter zu lösen. Aus der so entstandenen Zellsuspension wurden dezimale Verdünnungsreihen in sterilen Mikrotiterplatten (Sarstedt AG, Nümbrecht) hergestellt. Hierfür wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in 180  $\mu\text{l}$  0,9 % NaCl (w/v) dezimal bis zur Verdünnungsstufe  $1 \times 10^{-7}$  verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je zweimal 30  $\mu\text{l}$  auf gut getrocknete LB-Agarplatten gegeben und ü. N. bei 37 °C bebrütet. Die am nächsten Tag sichtbaren *P. aeruginosa* Kolonien wurden bei geeigneter Verdünnungsstufe gezählt,

um daraus die Anzahl der KBE pro ml berechnen zu können. Zur Bestimmung der KBE in Flüssigkulturen wurde entsprechend verfahren.

#### **2.5.6. MIC-Bestimmung in Flüssignährmedium**

Zur Bestimmung der MIC-Werte für die Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin für die *P. aeruginosa*-Isolate MH16, MH19, RN21, MH26, den Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 und die verwendeten Transposonmutanten, wurden pro Stamm mindestens 10 verschiedene Antibiotika-Konzentrationen zwischen 0 µg/ml und 25 µg/ml getestet. Je 100 µl doppelt-konzentrierten Nährmediums (LB-Medium, 1:10 LB oder AUM), mit 50 µl der entsprechenden Konzentrationen der zu testenden Antibiotika, wurden mit 50 µl einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) so beimpft, dass sich eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,05 ergab und 18 h ± 2 h bei 37 °C in Mikrotiterplatten bei 350 rpm inkubiert. Unter denselben Bedingungen wurde eine Negativkontrolle, die weder ein Antibiotikum enthielt, noch mit Bakterien-Vorkultur beimpft wurde, inkubiert. Die Positivkontrolle hingegen wurde wie beschrieben aus der Vorkultur beimpft und inkubiert, verblieb jedoch ohne Antibiotikum-Zusatz. Für die Auswertung wurden die Trübungen der Suspensionen nach 18 h ± 2 h mit einem Mikrotiterplatten Lesegerät (Biorad) bei 600 nm gemessen. Als minimale Inhibierungs-Konzentration (MIC) bezeichnet man die Konzentration eines Antibiotikums, bei der kein sichtbares Wachstum der Bakterien nach 18 h ± 2 h in der Kultur festzustellen ist (Andrews, 2001).

#### **2.5.7. MIC-Bestimmung auf Agarnährmedium**

Zur Bestimmung der MIC-Werte der getesteten Antibiotika für die zu untersuchenden *P. aeruginosa*-Stämme beim Wachstum auf Agar-Nährmedien wurde der Test wie folgt durchgeführt. Die Vorkulturen der zu untersuchenden Stämme wurden ü. N. bei 37 °C in LB-Medium geschüttelt und anschließend mit LB-Medium auf eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,1 verdünnt. Je 100 µl dieser Suspension wurden auf Nähragarplatten (LB-Medium, 1:10 LB, AUM) ausplattiert, um einen konfluenten Bakterienrasen zu erzeugen. Antibiotika-Testblättchen (Cellulose, Ø = 9 mm; Macherey-Nagel, Düren) wurden mit je 30 µl der zu testenden Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen (0 - 500 µg/ml) getränkt und

auf den zuvor beimpften Agar gelegt. Nach 24 h wurden die Durchmesser der Hemmhöfe gemessen, die rund um die Antibiotika-Testblättchen entstanden waren. Die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die einen Hemmhof um das Antibiotika-Testblättchen erzeugte wurde als MIC definiert.

#### **2.5.8. Absterbeverhalten planktonischer Zellen unter Antibiotika-Einwirkung**

Zur Dokumentation des Absterbeverhaltens von *P. aeruginosa* durch Einwirkung unterschiedlicher Antibiotika unter verschiedenen Bedingungen wurden folgende Experimente durchgeführt. Aus einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) wurden je 20 ml Medium (LB, 1:10 LB, AUM) auf eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,05 bzw. 0,1 für 1:10 LB und AUM beimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 1,5 h wurde die jeweils 5-fache MIC der Antibiotika Tobramycin (15 µg/ml) und Ciprofloxacin (3 µg/ml) hinzugegeben. Ab diesem Zeitpunkt (0 h) wurden stündlich Proben genommen und deren OD<sub>578 nm</sub> und die Anzahl der KBE/ml (Kapitel 2.5.5) bestimmt.

#### **2.5.9. Kontrolle der Antibiotikastabilität in verschiedenen Nährmedien**

Zur Überprüfung der Stabilität der verwendeten Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin in jedem der drei Nährmedien (LB-Medium, 1:10 LB und AUM) wurde steriles Medium mit Antibiotikazusatz wie für die in Kapitel 2.5.6 beschriebene MIC-Bestimmungen 24 h lang inkubiert. Zuvor und anschließend wurde mit je 30 µl dieser Lösung der in Kapitel 2.5.7 erläuterte Hemmhofest durchgeführt. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm DH10B verwendet. Die Ausmaße der entstandenen Hemmhöfe nach 0 h und 24 h gaben Aufschluss über etwaigen Wirkungsverlust der verwendeten Antibiotika.



#### **2.5.10. Absterbeverhalten von Biofilmen unter Antibiotika-Einwirkung**

Zur Dokumentation des Absterbeverhaltens von *P. aeruginosa*-Biofilmen durch die Einwirkung unterschiedlicher Antibiotika unter verschiedenen Bedingungen wurden folgende Experimente durchgeführt. Nach der Anzucht von Biofilmen auf Membranfiltern (Kapitel 2.5.4) wurden die Filter auf Agarnährmedium (1:10 LB, AUM) transferiert, die die 10-fache MIC der zu testenden Antibiotika, Tobramycin (30 µg/ml) und Ciprofloxacin (6 µg/ml), enthielten. Nach 4 h, 8 h, 16 h und 24 h Inkubation unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen bei 37 °C wurden die Biofilme wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben geerntet und KBE-Bestimmungen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde pro Versuchsreihe je ein Biofilm auf Agarnährmedium ohne Antibiotikum, unter sonst identischen Bedingungen inkubiert.

#### **2.5.11. Antibiotikaresistenz-Tests**

Zur Überprüfung der allgemeinen Antibiotikaempfindlichkeit von *P. aeruginosa*-Stämmen wurden kommerziell erhältliche Antibiotika-Teststreifen (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) verwendet, die speziell für Pseudomonaden und Harnwegs isolate konzipiert sind (ATB<sup>TM</sup>PSE1, #14341; ATB<sup>TM</sup>UR1, #14331). Diese Teststreifen enthalten jeweils 16 Antibiotika aus 10 verschiedenen Wirkstoffklassen in Konzentrationen, die den Empfehlungen des DIN Komitees entsprechen. Die Inokulation, Inkubation und Auswertung der Teststreifen erfolge nach den Anweisungen des Herstellers.

#### **2.5.12. Diffusion der Antibiotika durch *P. aeruginosa* Biofilme**

Wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben wurden 24 h inkubierte Filterbiofilme von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1Δ*algR* angezogen und anschließend 16 h lang auf Antibiotika-haltigem Nähragar inkubiert. Während dieser Zeitdauer waren auf den Biofilmen Antibiotikatestblättchen (AB-Testblättchen) platziert. Diese nahmen durch den Biofilm hindurch diffundierte Antibiotika-Mengen auf. Desweiteren wurden AB-Testblättchen direkt auf dem Antibiotika-haltigen Nähragar platziert, die zum Vergleich

als Negativkontrolle mit ungehinderter Antibiotikadiffusion dienten. Anschließend erfolgte eine Inkubation dieser AB-Testblättchen auf einem konfluenten Bewuchs durch *E. coli* DH10B (Kapitel 2.4). Die in den AB-Testblättchen enthaltenen Mengen Antibiotikums verursachten Hemmhöfe unterschiedlicher Größe im Bakterienrasen. Die Hemmhöfe wurden vermessen um ihre Größen in mm miteinander vergleichen zu können.

### **2.5.13. Absterbeverhalten unter Menadion-Einfluss**

Zum Nachweis der Toleranz von *P. aeruginosa* gegenüber oxidativem Stress, wurde Menadion verwendet, welches die Bildung von Superoxid-Radikalen anregt. Wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben wurden ü. N. -Vorkulturen in 1:10 LB oder AUM inkubiert und damit je 5 ml PBS (Kapitel 2.2.3) auf eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,1 beimpft. Vor der Inkubation (37 °C, 4 h) wurde Menadion-Natrium-Bisulfit (Sigma-Aldrich, München) in Konzentrationen von 0 mg/ml bis 50 mg/ml hinzugegeben. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben eine KBE-Bestimmung durchgeführt um die Zahl der überlebenden Zellen festzustellen.

## **2.6. Biochemische Methoden**

### **2.6.1. Quantitativer Nachweis von Uronsäuren**

Die Quantitative Bestimmung von Uronsäuren wurde nach der Biphenyl-Methode von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) durchgeführt.

Hierfür wurden mit den zu testenden *P. aeruginosa*-Stämmen Filterbiofilme wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben beimpft, inkubiert und geerntet. Die Zellsuspension wurde anschließend sterilfiltriert (Celluloseacetatfilter, 0,2 µm, Sarstedt AG, Nümbrecht), um zellfreie EPS-haltige Proben zu erhalten. Zu 0,2 ml Probe wurden im Eisbad 1,2 ml Lösung 1 (Kapitel 2.2.1) gegeben. Nach 10 min im Eisbad wurde der Ansatz gemischt und für 5 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen für 5 min im Eisbad

wurden 20 µl Lösung 2 (Kapitel 2.2.1) hinzugegeben und der Ansatz wiederum gemischt. Nach 5 min bei RT wurde im Photometer die Absorption bei 520 nm gegen H<sub>2</sub>O deion. gemessen. Jede Probe wurde zweifach angesetzt und es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Als Standard wurde gereinigtes Alginat aus *P. aeruginosa* FRD1 (0-200 µg/ml) wie beschrieben behandelt. Anhand einer daraus erstellten Kalibrierreihe konnte die Alginatkonzentration der Proben berechnet werden.

### 2.6.2. Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

Für die Quantifizierung der unter Antibiotika-Einfluss gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurden aus einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) je 10 ml Medium (1:10 LB, AUM) auf eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,1 beimpft und 1,5 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Antibiotikazugabe. Es wurde jeweils mit der 5-fachen MIC (Tobramycin = 15 µg/ml, Ciprofloxacin = 3 µg/ml) beider Antibiotika inkubiert, während die Negativkontrolle ohne Antibiotikazugabe verblieb. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde von allen Proben die Anzahl der KBE/ml bestimmt (Kapitel 2.5.5) und je 2 ml der Zellsuspensionen bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in jeweils 1 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) resuspendiert, die 2 % (v/v) DMSO enthielt. Je 1 ml dieser Probenlösung wurde mit 5 µl Luminollösung (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) (4 mM in 1 M NaOH) versetzt und die entstehende Chemolumineszenz nach 10 sec. im Luminometer (Biocounter M2010, Lumac, Niederlande) vermessen. Hierbei entsprach die Menge der durch die Luminol-Reaktion emittierten relativen Lichteinheiten (RLU) der Menge des in den *P. aeruginosa*-Zellen gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Luminol wird in alkalischem Milieu von ROS zu einem instabilen Intermediat oxidiert, welches ein Photon im blauen Bereich des Lichtspektrums emittiert, wenn es vom angeregten in den Singulett-Grundzustand übergeht.

## 2.7. Metabolomanalyse

Der Begriff Metabolom umfasst alle charakteristischen Stoffwechseleigenschaften einer Zelle. Dazu gehören die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte einer Zelle, die Enzymaktivitäten und die Interaktionen zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen.

Die Vermessung der Metabolite erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Dabei dient der Gaschromatograph der Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und die Massenspektrometrie der Identifizierung der so erhaltenen einzelnen Substanzen. Die GC-MS ist eine sehr empfindliche Analysemethode, mit deren Hilfe sich Substanzmengen unterhalb von 0,1 ng nachweisen lassen.

### 2.7.1. Kultivierung der Filterbiofilme und Zellernte

Um Metabolit-Konzentrationen von Bakterien während des Biofilmwachstums auf unterschiedlichen Medien und unter dem Einfluss verschiedener Antibiotika zu untersuchen, wurden für eine Messung 150 mg Feuchtmasse benötigt, was der Erntemenge von 8 Filterbiofilmen entsprach.

Dazu wurden Filterbiofilme wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben beimpft und kultiviert. Anschließend wurden jeweils zwei Filter nacheinander in 1 ml kalter 0,9 % (w/v) NaCl in sterilen Eppendorfgläsern geerntet. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C wurden die Überstände vollständig verworfen und das Zellsediment gewogen um die Feuchtmasse zu bestimmen. Das Zellsediment wurde in insgesamt 1,5 ml eiskaltem Methanol/Ribitol (8 µg/ml (w/v)) resuspendiert, bevor die Zellen im Ultraschallbad für 15 min bei 70 °C und 35 kHz aufgeschlossen wurden. Nach der Zelllyse und einer 2-minütigen Abkühlung im Eisbad wurden insgesamt 1,5 ml H<sub>2</sub>O deion. hinzugegeben und die Proben für 1 min intensiv geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 ml Chloroform und wiederum 1 min intensiven Mischens. Nach 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurden insgesamt 2 ml der oberen (polaren) Phase abgenommen und in ein Eppendorfglas überführt. Die Trocknung der Proben erfolgte ü. N. in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg). Die

getrockneten Proben konnten nun bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, bevor sie derivatisiert und vermessen wurden. Dazu mussten die Lagerungsgefäße mittels Parafilm luftdicht verschlossen werden, um eine Verflüchtigung der Metabolite zu vermeiden.

### **2.7.2. Kultivierung planktonischer Kulturen und Zellernte**

Zur Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen von Bakterien während des Wachstums in planktonischer Kultur in AUM und unter dem Einfluss verschiedener Antibiotika, wurden für eine Messung 20 mg Biotrockenmasse (BTM) benötigt.

Dazu wurden je 200 ml AUM in Schikanekolben aus einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) auf eine  $\text{OD}_{578\text{ nm}}$  von 0,1 beimpft und für 1,5 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Antibiotikazugabe, wobei jeweils die 1 x MIC beider Antibiotika (Tobramycin =  $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ , Ciprofloxacin =  $0,3\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) verwendet wurde, die Negativkontrollen verblieben ohne Antibiotikazusatz. Nach weiteren 2 h Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm, wurde von jeder Kultur eine Menge geerntet, die einer BTM von 20 mg entsprach (38 – 92 ml) und für 20 min bei 4.000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Zellsedimente in jeweils 10 ml  $0,9\text{ }\%$  (w/v) NaCl resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4.000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurde dieser Waschschrift noch einmal wiederholt. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurden die Zellsedimente in jeweils 1,5 ml eiskaltem Methanol/Ribitol ( $4\text{ }\mu\text{g/ml}$  (w/v)) resuspendiert, bevor die Zellen im Ultraschallbad für 15 min bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 35 kHz aufgeschlossen wurden. Nach der Zelllyse und einer 2-minütigen Abkühlung im Eisbad wurden 1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  deion. hinzugegeben und die Proben für 1 min intensiv geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 ml Chloroform und wiederum 1 min intensiven Mischens. Nach 15 min Zentrifugation bei 4.000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden insgesamt 1,5 ml der oberen (polaren) Phase abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Trocknung der Proben erfolgte ü. N. in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg). Die getrockneten Proben konnten nun bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, bevor sie derivatisiert und vermessen wurden. Die Lagerungsgefäße wurden mittels Parafilm luftdicht verschlossen, um eine Verflüchtigung der Metabolite zu vermeiden.

### 2.7.3. Derivatisierung und Vermessung der Proben

Zur Derivatisierung der eingetrockneten Proben wurden je 50 µl Methoxyamin (in Pyridin, mit einer Konzentration von 20 mg/ml) zugefügt, kurz intensiv geschüttelt und für 90 min bei 200 rpm und 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 80 µl N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) zugegeben, erneut intensiv geschüttelt und für weitere 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bevor die Proben bei RT für weitere 2 h inkubiert wurden. Schließlich wurden 6 µl Alkanmix hinzu gegeben und die Probe 5 min bei 13.400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Glasvials überführt. Anschließend konnten die Proben mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) vermessen werden. Dies wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schomburg (Institut für Bioinformatik und Biochemie der TU Braunschweig) durchgeführt.

## 2.8. Transkriptomanalyse

*Gene Expression Microarrays* ermöglichen es, eine Analyse des Transkriptoms von Zellen durchzuführen, die sich an verschiedene Wachstumsbedingungen anpassen. Es ist möglich, Veränderungen der Expressionsstärke bestimmter Gene während dieser Anpassung zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurden dazu kundenspezifische *Gene Expression Microarrays* der Firma Agilent genutzt. Das Genom von *P. aeruginosa* PAO1 wurde für das Design mittels „eArray“ Software (Agilent Technologies) verwendet. Für jeden open reading frame (ORF), inklusive der Gene für rRNAs und tRNAs, wurden 6 Oligonukleotide pro Array hybridisiert.

### 2.8.1. Kulturbedingungen und Zellernte

Aus einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) wurden je 20 ml AUM (Kapitel 2.3.3) in einem 100 ml Schikanekolben auf eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,1 beimpft und für 1,5 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde Tobramycin (1-fache MIC, 3 µg/ml) zu

den Kulturen gegeben und die Inkubation für weitere 60 min fortgesetzt. Aus drei von einander unabhängigen Kulturen wurde je 1 ml entnommen und diese für die RNA-Präparation vereinigt. Diese 3 ml wurden in 6 ml RNA Protect<sup>®</sup> Bacteria Reagent (Quiagen, Hilden) aufgenommen und gründlich vermischt, bevor eine 5-minütige Inkubation und eine Zentrifugation (4.000 rpm, 10 min) zur Zellernte erfolgten. Das Zellsediment wurde mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O (MiliQ) gewaschen, erneut zentrifugiert (4.000 rpm, 5 min) und sofort zur RNA-Präparation verwendet.

### **2.8.2. RNA-Präparation und Qualitätskontrolle**

Vor der RNA-Isolierung wurden alle verwendeten Materialien und Lösungen 2-fach autoklaviert um eine Kontamination mit RNasen zu minimieren. Alle verwendeten Chemikalien wurden RNase-frei bezogen und es wurde nur mit RNase-freien Geräten gearbeitet. Alle Präparationsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, gekühlt. Zur Präparation der RNA wurde das RNeasy Kit von Quiagen (Hilden) verwendet, wobei die RNA nach Herstellerempfehlung auf der Säule einem DNase-Verdau unterzogen wurde. Anschließend wurde die aufgereinigte RNA zweimal mit 25 µl RNase freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration mittels Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab) ermittelt.

Anschließend wurde die RNA mittels Bioanalyzer (2100 Expert, Agilent) auf ihre Qualität hin untersucht. Hierfür wurden die Proben 2 min lang bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. Zur Analyse wurden Procaryote Total RNA Nano Chips (Agilent) gemäß Herstellerangaben angewendet. Für die Verwendung der präparierten RNA für *Gene Expression Microarrays* sollten sowohl die 16S rRNA, als auch die 23S rRNA als klare Banden nach Gelelektrophorese erkennbar sein und die Proben eine „RNA-Integrity-Number“ (RIN) von mindestens 8,5 von 10 aufweisen, eine geringere Integrität weist auf eine zu starke Degradation der RNA hin.

### 2.8.3. Präparation der *Agilent Gene Expression Microarrays*

Nach Herstellerempfehlung wurden jeweils 2 µg RNA mit dem USL Fluoreszent Labeling Kit für Agilent Gene Expression Microarrays von Kreatech markiert. Hierbei wurden die aus dem *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp gewonnenen Proben mit dem Farbstoff Cy3, und die aus der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante gewonnenen Proben mit dem Farbstoff Cy5 markiert. Neben der Markierung von drei von einander unabhängigen biologischen Replikaten wurde ein technisches Replikat jeweils einer Probe umgekehrt markiert („dye swap“). Anschließend wurden die jeweiligen Einbauraten der Farbstoffe in die RNA mittels Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab) bestimmt.

Nach dem Labeling wurden je 825 ng RNA Cy3 markierter Probe mit 825 ng RNA Cy5 markierter Probe zusammengeführt und mit „Blocking“ Agent und Fragmentierungspuffer in einem Volumen von 25 µl für 30 min bei 60 °C in Dunkelheit inkubiert. Durch die Zugabe von 25 µl Hybridisierungspuffer HI-RPM wurde die Fragmentierung gestoppt, bevor die Proben zur Hybridisierung (17 h, 65 °C, 10 rpm) auf den Microarray aufgetragen werden konnten. Anschließend wurde der Microarray nach Herstellerangaben gewaschen, getrocknet und unverzüglich im DNA-Microarray Scanner (High Resolution Microarray Scanner, Agilent) ausgelesen.

### 2.8.4. Prozessierung der *Agilent Gene Expression Microarrays*

Die *Agilent Gene Expression Microarrays* wurden nach der Datenerfassung mit Hilfe des Programms „R“ durch Nutzung von „Bioconductor“ prozessiert ([www.bioconductor.de](http://www.bioconductor.de); Gentleman *et al.*, 2004). Die Prä-Prozessierung basierte auf dem „marray-Package“ durch Nutzung der „read.Agilent“-Funktion. Der Kontroll-Code wurde speziell für die Nutzung von Agilent Microarrays adaptiert und die Arrays zur Qualitätskontrolle auf Artefakte und große Unterschiede innerhalb der Replikate untersucht. Durch eine „Loess“-Normalisierung (Yang *et al.*, 2005) wurde die 2-Kanal-Normalisierung vorgenommen. Differentiell exprimierte Gene wurden durch das „limma-Package“ unter Nutzung von „lmFit“ für lineares Modelling, „eBayes“ für Signifikanz-Kalkulationen und „Top Table“ für die Extraktion der differentiell exprimierten Gene erhalten. Die „Top Table“ wurde mit allen Sonden erstellt, deren



$\log_2(\text{FC}) \geq 0,8$  betrug. Die Zusammenfassung der verschiedenen Sonden für jedes Gen erfolgte durch die Kalkulation der Median-Werte.

## 2.9. Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmiden aus *P. aeruginosa* oder *E. coli* wurden 2 ml einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) mit entsprechendem Antibiotikazusatz bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 300 µl P1-Lösung (Kapitel 2.2.6) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2-Lösung (Kapitel 2.2.6), wurde sofort vorsichtig gemischt, bevor 5 min bei RT inkubiert werden konnte. Zur Fällung von genomischer DNA und Proteinen wurden 300 µl P3-Lösung (Kapitel 2.2.6) hinzugefügt und der Ansatz gründlich gemischt. Es folgten eine 10 min Inkubation auf Eis und eine 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand, erneut 10 min auf Eis inkubiert um restliche Proteine zu fällen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 15 min, nach dem wiederum das Sediment verworfen wurde. Die erhaltenen Überstände wurden mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt um die Plasmide zu fällen. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und 15 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand vollständig entfernt und das Sediment mit 100 µl absolutem Ethanol gewaschen werden konnte. Hierzu wurde der Ethanol auf das Sediment gegeben und sofort für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Ethanol wurde entfernt und das Sediment unter der Sicherheitswerkbank getrocknet. Zur Aufbewahrung wurde das Sediment in 20 µl H<sub>2</sub>O deion. resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.9.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe der isolierten Plasmid-DNA Fragmente wurde mit Hilfe eines Agarose-Gels abgeschätzt. Zur optimalen Auftrennung der DNA Fragmente verschiedener Größe

wurden 1 %ige (w/v) Agarose-Gele verwendet (1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer), in die zum Größenvergleich neben der DNA die „1 kb DNA ladder“ (Fermentas) aufgetragen wurde. Nach der Elektrophorese bei 110 V inkubierten die Gele zur Visualisierung der DNA für 15 – 20 min in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml), bevor diese bei UV-Licht (266 nm) dokumentiert werden konnten.

### **2.9.3. Quantifizierung von DNA und RNA**

Zur Bestimmung der DNA- oder RNA-Konzentration und ihrer Qualität wurde deren Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm im Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab) vermessen. Eine Absorption bei 260 nm Wellenlänge von 1,0 entsprach hierbei einer DNA Konzentration von 50 µg/ml oder einer RNA Konzentration von 40 µg/ml. Um Verunreinigungen mit Proteinen und anorganischen Komponenten, wie Phenol auszuschließen, wurden nur Proben weiter verwendet, deren Quotienten der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm über 1,8 und bei 260 nm zu 230 nm über 2,0 lagen.

### **2.9.4. Anwendung von Restriktionsendonukleasen**

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs in den empfohlenen Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 5 U Enzym/µg DNA eingesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor der Ansatz in einem 1 %igen (w/v) Agarose-Gel zur Visualisierung aufgetrennt wurde.

### **2.9.5. Ligation**

Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mittels T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zuvor geschnittene Vektor-DNA und Insert-DNA wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen (1:3, 1:5, 1:7) zusammengegeben und ü. N. bei 17 °C inkubiert.

### 2.9.6. Herstellung Rubidium-kompetenter Zellen

Aus einer ü. N. Vorkultur (Kapitel 2.5.3) von *E. coli* DH10B wurden 150 ml LB-Medium auf eine OD<sub>578 nm</sub> von 0,05 beimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>578 nm</sub> von 0,5 - 0,6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Diese Kultur wurde für 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde in 20 ml eiskaltem TBF-I Puffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 4.000 rpm und 4 °C. Wiederum wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 2 ml TBF-II Puffer resuspendiert. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurde diese Zellsuspension in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

#### TBF-I Puffer:

30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
100 mM	RbCl
15 % (v/v)	Glycerin

Ad 200 ml H<sub>2</sub>O deion.,  
pH 5,8 (Essigsäure)

#### TBF-II Puffer:

10 mM	PIPES, pH 6,8
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl
15 % (v/v)	Glycerin

Ad 100 ml H<sub>2</sub>O deion.,  
pH 6,5 (1 M KOH)

### 2.9.7. Transformation chemokompetenter Zellen

Proben chemokompetenter *E. coli* DH10B (Kapitel 2.9.6) wurden 15 min auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Plasmid-DNA gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 45 sec bei 42 °C inkubiert, bevor 400 µl LB-Medium hinzugegeben wurden. Die Ansätze wurden anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert und zu jeweils 100 µl auf LB-Agar mit 10 µg/ml Gentamicin ausplattiert. Diese Nähragarplatten enthielten außerdem 0,1 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion. Nach Inkubation bei 37 °C ü. N. wurden resistente, positive Kolonien in LB-Medium mit 10 µg/ml Gentamycin überimpft und ü. N. bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

### 2.9.8. Elektroporation von *P. aeruginosa*

Zur Transformation von *P. aeruginosa* mittels Elektroporation wurden Zellen eines ü. N. gewachsenen Bakterienrasens in 500 µl H<sub>2</sub>O (MiliQ) aufgenommen und suspendiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden die Zellsedimente zweimal mit jeweils 500 µl H<sub>2</sub>O (MiliQ) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl H<sub>2</sub>O (MiliQ) aufgenommen, mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) gegeben. Die Elektroporation wurde mit folgenden Einstellungen in einem GenePulserII (BioRad, München) durchgeführt:

Kapazität	25, 0 µF
Spannung	1,8 kV
Widerstand	200,0 Ω
Spannungsstoß	4,8 - 5,0 ms

Sofort wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium (Kapitel 2.3.1) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl dieser Zellsuspension auf LB-Agar (Kapitel 2.3.1) ausplattiert, der Antibiotika in entsprechender Konzentration enthielt.

### 2.9.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Überprüfung von Klonierungen wurden die gewünschten DNA Fragmente mittels PCR amplifiziert und anschließen auf einem Agarosegel sichtbar gemacht.

Für die Durchführung einer Kolonie-PCR wurde eine Einzelkolonie in 20 µl Lysispuffer transferiert, für 15 min bei 95 °C inkubiert und mit 180 µl H<sub>2</sub>O (MiliQ) verdünnt. Aus diesem Ansatz wurden je 0,5 µl für einen PCR-Ansatz von 20 µl verwendet, für die Amplifikation von präparierter DNA wurden jeweils 50 ng eingesetzt. Desweiteren enthielt jeder PCR-Ansatz einen für die verwendete DNA Polymerase geeigneten Puffer, 10 pmol der verwendeten Primer, 200 µm dNTP's, 0,5 U DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase oder Phusion) und 3 % DMSO. Dem ersten Programmschritt (Denaturierung) des verwendeten PCR-Programms folgten 25 – 30 Zyklen der Denaturierung, des Annealings der Primer und der Elongation der Amplifikate. Die

Annealing-Temperaturen variierten je nach verwendeten Primern, während die Zeitdauer der Elongations-Schritte von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente abhängig war. Hierbei wurde eine Syntheserate der Taq Polymerase von 1.000 bp/min angenommen.

Lysispuffer:	25 µl	10 % (w/v) SDS
	250 µl	0,2 M NaOH
	<u>725 µl</u>	<u>H<sub>2</sub>O deion.</u>
	1.000 µl	(frisch anzusetzen)

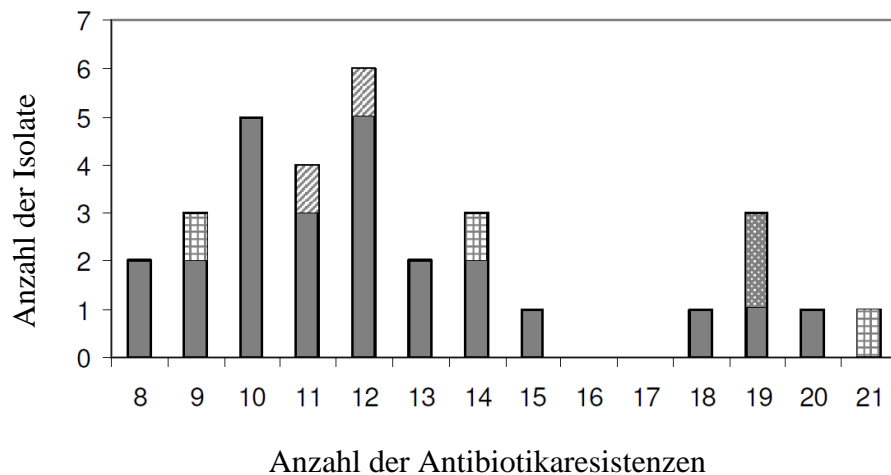
### 3. Ergebnisse und Diskussion

Der opportunistisch humanpathogene *P. aeruginosa* ist in der Lage, besonders in immunsupprimierten Patienten schwere akute und chronische Infektionen zu verursachen. Neben Lungeninfektionen in Cystische Fibrose-Patienten, Infektionen der Augen und von Wunden, ist *P. aeruginosa* einer der häufigsten Verursacher komplizierter Infektionen des Harnwegs (Ronald, 2002; Shigemura *et al.*, 2006). Der größte Teil dieser Harnwegsinfektionen ist nosokomialer Natur und mit der Verwendung von Kathetern assoziiert. Harnwegsinfektionen sind mit 40 % der Fälle die häufigsten nosokomialen Infektionen (Mittal *et al.*, 2009). Aufgrund seiner ausgeprägten intrinsischen Antibiotikaresistenz und seiner Fähigkeit während einer antibiotischen Behandlung neue Resistenzmechanismen zu entwickeln, sind Infektionen mit *P. aeruginosa* nur schwer zu behandeln (Rossolini und Mantengoli, 2005). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Antibiotikaresistenz-Mechanismen von *P. aeruginosa* genau zu kennen. Es gilt, neue Strategien für Antibiotikatherapien zu entwickeln und geeignete Zielstrukturen für bisher unbekannte Antibiotika zu identifizieren.

#### 3.1. Antibiotikaresistenz-Profile klinischer *P. aeruginosa*-Isolate

In dieser Arbeit wurden insgesamt 32 klinische *P. aeruginosa*-Isolate, deren Virulenzeigenschaften zuvor intensiv analysiert worden sind (Tielen *et al.*, 2010), auf ihre Antibiotikaresistenz-Profile hin untersucht. Hierfür wurden, wie in Kapitel 2.5.11

beschrieben, zwei kommerziell erhältliche Antibiotika-Teststreifen der Firma bioMérieux verwendet, die speziell für Pseudomonaden und Harnwegs isolate konzipiert sind (siehe Tabelle 21 im Anhang). Die insgesamt 23 verschiedenen, in den Teststreifen enthaltenen Antibiotika lassen sich in 10 unterschiedliche Wirkstoffklassen einordnen. Die verwendeten Antibiotikakonzentrationen entsprachen hierbei den Empfehlungen des DIN-Komitees.



**Abbildung 4:** Anzahl der Antibiotikaresistenzen, 32 klinischer *P. aeruginosa*-Harnwegs isolate. Die Resistenz-Profile wurden mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Teststreifen der Firma bioMérieux bestimmt. Alle Untersuchungen wurden in von einander unabhängigen Doppelbestimmungen und mit zwei unterschiedlichen Testsystemen durchgeführt. Folgeisolate aus chronischen Infektionen sind gemustert: Infektion Nr. 1 gestreift, Infektion Nr. 2 kariert, Infektion Nr. 3 gepunktet.

Es wurde gezeigt, dass 26 der *P. aeruginosa* Harnwegs isolate Resistenzen gegen 8 bis 15 der getesteten Antibiotika aufwiesen, 6 weitere Stämme zeigten bis zu 21 Resistenzen (Abbildung 4). Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamen. Davon befanden sich 14 verschiedene, wie Penicilline und Cephalosporine in den Teststreifen, gegen die *P. aeruginosa* aufgrund von  $\beta$ -Lactamasen eine intrinsische Resistenz besitzt (Lambert, 2002). Das verbreitete Vorkommen von  $\beta$ -Lactamasen in *P. aeruginosa* wird als einer der Hauptgründe für das vermehrte Auftreten schwerer nosokomialer Harnwegsinfektionen diskutiert (Saha *et al.*, 2010). Neben der weit verbreiteten  $\beta$ -Lactam-Toleranz zeigten alle getesteten Stämme Resistenzen gegenüber Tetracyclin und Nitrofurantonin (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Anzahl der Antibiotikaresistenzen von 32 klinischen *P. aeruginosa*-Harnwegsisolaten. Die Resistenz-Profile wurden mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Teststreifen der Firma bioMérieux bestimmt. Alle Untersuchungen wurden in von einander unabhängigen Doppelbestimmungen und in zwei unterschiedlichen Testsystemen durchgeführt.

Antibiotikum	resistente Isolate	
	Anzahl	%
Ampicillin	32	100
Ampicillin-Sulbactam	32	100
Piperacillin	8	25
Piperacillin-Tazobactam	6	19
Cefazolin	31	97
Ceftazidim	1	3
Cefoxitin	32	100
Cefuroxim Axetil	32	100
Cefotaxim	24	75
Cefixim	32	100
Cefepim	1	3
Aztreonam	1	3
Imipenem	8	25
Meropenem	5	16
Gentamycin	8	25
Amikacin	8	25
Tobramycin	5	16
Levofloxacin	8	25
Ciprofloxacin	8	25
Cotrimoxazol	27	84
Nitrofurantoin	32	100
Fosfomycin	24	75
Tetracyclin	32	100

Einzig das Monobactam Aztreonam und die Cefalosporine Cefepim und Ceftazidim waren gegen fast alle (31 von 32) getesteten Harnwegs isolate wirksam (Tabelle 6).



Aztreonam, welches bereits erfolgreich in der Therapie von Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* eingesetzt wird (Plosker, 2010), ist eines der alternativen Therapeutika schwerer Harnwegsinfektionen (Rivera-Sanchez *et al.*, 2010). Die zurzeit am häufigsten zur Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen eingesetzten Antibiotika sind jedoch die Carbapeneme Imipenem und Meropenem, das Aminoglykosid Tobramycin und die Fluorchinolone Levofloxacin und Ciprofloxacin, oder Kombinationen dieser Wirkstoffe (Rossolini und Mantengoli, 2005; Obritsch *et al.*, 2005; Breidenstein *et al.*, 2008). Allerdings zeigten 5 der 32 getesteten *P. aeruginosa* Isolate (16 %) Resistenzen gegen alle diese Therapeutika und weitere 7 Stämme waren gegen einige davon resistent (Tabelle 6 und Tabelle 21 im Anhang). Ähnliche Resistenz-Profile klinischer *P. aeruginosa* Isolate wurden bereits in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Raja und Singh, 2007). *E. coli* und andere aus unkomplizierten und komplizierten Harnwegsinfektionen isolierte *Enterobacteriaceae* sind generell weniger Antibiotika-resistent (Hryniewicz *et al.*, 2001).

Insgesamt zählten 6 der getesteten Harnwegs isolate (19 %) nach der Definition von Defez *et al.*, 2004 zu den multiresistenten *P. aeruginosa*-Stämmen (Defez *et al.*, 2004). Sie waren gegen drei oder mehr antipseudomonadale Antibiotika resistent. Die Daten des „European Centre for Disease Prevention and Control“ (ECDC, <http://www.ecdc.eu.int/index.html>) weisen auf eine ständig steigende Anzahl von multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen hin. Während sie 1993 von 4 % multiresistenter *P. aeruginosa* Stämme berichteten, war diese Zahl im Jahr 2010 auf 17 % gestiegen (Obritsch *et al.*, 2004; Giamarellou, 2010). Dieser Trend zeigte sich auch hier in den steigenden Zahlen der Resistenzen einiger *P. aeruginosa* Folge-Isolate aus chronischen Harnwegsinfektionen (Abbildung 4). Die klonale Verwandtschaft dieser Stämme wurde zuvor mit Hilfe von „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) nachgewiesen (Tielen *et al.*, 2010). Zwei der chronischen Infektionen begannen zunächst mit *P. aeruginosa*-Stämmen, die lediglich 9 oder 11 Resistenzen aufwiesen (Tabelle 21 im Anhang), allerdings entwickelten sie während der andauernden Infektion und besonders während der Antibiotika-Behandlung des Patienten neue Antibiotikaresistenzen. Das in Abbildung 4 gestreift dargestellte Folge-Isolat MH25 der chronischen Infektion Nr. 1 zeigte im Test eine Resistenz mehr, als das einen Monat zuvor gewonnene Isolat MH18. Es war eine Resistenz gegen Meropenem entstanden, mit dem der Patient während dieser Zeit therapiert worden war. Die Entwicklung der chronischen Harnwegsinfektion Nr. 2 (Abbildung 4, kariert dargestellt) verlief sogar

noch dramatischer, die Anzahl der Resistenzen stieg hier von 9 auf 21 innerhalb einer Behandlungsdauer von 3,5 Monaten. In der Literatur ist beschrieben, dass sich aus 27-72 % der chronischen *P. aeruginosa* Infektionen durch ursprünglich antibiotikaempfindliche Stämme während der antibiotischen Behandlung multiresistente Stämme entwickeln (Obritsch *et al.*, 2005). Das Isolat einer dritten chronischen Infektion (Abbildung 4, gepunktet dargestellt) änderte sein Antibiotikaresistenz-Profil während der Behandlungsdauer nicht, es war allerdings mit 19 Antibiotikaresistenzen schon zuvor zu den multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen zu zählen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, wie besorgniserregend die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen hin zu multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen während der Behandlung von Harnwegsinfektionen ist.

### **3.2. Analyse der minimalen Inhibierungskonzentration (MIC)**

Wie zuvor gezeigt, besitzt *P. aeruginosa* eine hohe intrinsische Antibiotika-Resistenz und entwickelt zudem immer neue Resistenzen, was zur Zunahme von multiresistenten Stämmen führt (Henwood *et al.*, 2001). Dies ist vor allem unter unzureichender Antibiotikatherapie der Fall und macht *P. aeruginosa* zu einem immer größer werdenden hygienischen Problem.

Es galt nun die Frage zu beantworten, wie sich die Bedingungen (Nährstoffzusammensetzung, Wachstumsphase, Wachstum als Biofilm) innerhalb des menschlichen Harnweges auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten im Vergleich zum Laborstamm PAO1 auswirken.

#### **3.2.1. Stabilität der verwendeten Antibiotika**

Zur Überprüfung der Stabilität der getesteten Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin in jedem der verwendeten Nährmedien (LB-Medium, 1:10 LB, AUM) wurden die in Kapitel 2.5.9 beschriebenen Stabilitätstests durchgeführt. Nachdem steriles Medium mit Antibiotikazusatz wie für die in Kapitel 2.5.6 beschriebene MIC-

Bestimmungen inkubiert worden war, wurden mit je 30 µl dieser Lösung die in Kapitel 2.5.7 erläuterten Hemmhoftests durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7:** Antibiotikastabilitäts-Test. Die Radien der im *E. coli*-Rasen (DH10B) erzeugten Hemmhöfe sind, abzüglich der Radien der verwendeten Antibiotikatestblättchen, in mm angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei von einander unabhängig durchgeführten Doppelbestimmungen.

Zeit [h]	Hemmhöfe [mm]			
	1:10 LB-Medium		AUM	
	Tobramycin	Ciprofloxacin	Tobramycin	Ciprofloxacin
0	4,0 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,0 ± 0,0	4,5 ± 0,5
24	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5

Sowohl das Aminoglykosid Tobramycin, als auch das Fluorchinolon Ciprofloxacin verursachten in einem konfluenten Bewuchs mit *E. coli* DH10B nach 24 stündiger Inkubation in allen Nährmedien noch gleichgroße Hemmhöfe wie vor Beginn des Kontrollexperiments. Dies zeigt, dass es unter den in dieser Arbeit verwendeten Testbedingungen innerhalb von 24 h keine Abnahme der Antibiotika-Aktivität gab.

### 3.2.2. Antibiotikasensitivität von *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten in Flüssignährmedium

Zunächst galt es der Frage nachzugehen, inwieweit sich klinische *P. aeruginosa*-Isolate während einer Harnwegsinfektion und deren Behandlung an diese Bedingungen anpassen. Außerdem sollte ein evtl. Einfluss der Nährstoffsituation innerhalb des Harnwegs auf die Antibiotikatoleranz nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin verwendet, die aktuell auch in der Behandlung von *P. aeruginosa* Infektionen angewendet werden (Rossolini und Mantengoli, 2005; Obritsch *et al.*, 2005; Breidenstein *et al.*, 2008). Wie zuvor gezeigt sind unter Standardbedingungen lediglich 16 % der getesteten *P. aeruginosa* Harnwegsisolaten gegen Tobramycin und 25 % gegen Ciprofloxacin resistent (Tabelle 6).

Wird das Wachstum von Bakterien in einem Medium durch die Zugabe eines Antibiotikums gehemmt, so geschieht dies erst ab einer bestimmten Konzentration. Diese ist für jedes Antibiotikum und für jeden Bakterien-Stamm spezifisch. Sie ist als minimale Inhibierungskonzentration (MIC) definiert und kann nach Inkubation der Bakterien in Standardmedien nach  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  abgelesen werden (Andrews, 2001). Die MIC-Werte für Tobramycin und Ciprofloxacin wurden für vier ausgewählte Harnwegs isolate und den Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 unter standardisierten Bedingungen getestet, wie sie auch für diagnostische „Screenings“ in der Medizin verwendet werden (Andrews, 2001). Die Durchführung der MIC-Bestimmungen ist in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Auf diese Weise wurden neben denen in LB-Medium auch die MICs in AUM und 1:10 LB-Medium, in welchem die Bakterien vergleichbares Wachstum aufweisen wie in AUM (Rosin, 2011), ermittelt. Im Standard-Vollmedium LB, erreicht *P. aeruginosa* im Vergleich ein etwa 10-fach erhöhtes Wachstum (pers. Mitteilung, Rosin).

Die vier klinischen Isolate MH16, MH19, RN21 und MH26 wurden ausgewählt, da ihre Antibiotikaresistenz-Profile dem des Laborstamms *P. aeruginosa* PAO1 sehr ähnlich sind, wobei das Isolat MH16 im Screening lediglich eine erhöhte  $\beta$ -Lactam Resistenz aufwies (siehe Tabelle 21 im Anhang). Bei den *P. aeruginosa*-Isolaten MH16 und MH26 handelt es sich um klinische Harnwegs isolate aus Mittelstrahlurin. Das Isolat MH19 stammt aus einer katheterassoziierten Infektion. Das Isolat RN21 wurde, im Gegensatz zu den anderen, aus einer Klinik stammenden Isolaten, in einer Privatpraxis aus dem Harnweg eines Patienten isoliert.

Wie in Tabelle 8 zu erkennen ist, hatte die veränderte Nährstoffzusammensetzung der verschiedenen Medien einen deutlichen Einfluss auf die Antibiotikatoleranz der getesteten *P. aeruginosa* Stämme. Die reduzierte Nährstoffverfügbarkeit in 1:10 LB-Medium verringerte die MIC-Werte (= erhöht die Empfindlichkeit) aller getesteten Stämme gegenüber Tobramycin etwa um das dreifache im Vergleich mit unverdünntem LB. Die Empfindlichkeit der getesteten Stämme gegenüber Ciprofloxacin erhöhte sich allerdings nur um etwa 20 %.

**Tabelle 8:** Minimale Inhibierungskonzentrationen (MIC) von Tobramycin and Ciprofloxacin der *P. aeruginosa* Harnwegs isolate und dem Laborstamm PAO1. Die planktonischen Kulturen wurden in unterschiedlichen Medien aerob kultiviert, um nach 18 h  $\pm$  2 h bei 37 °C und 350 rpm die MIC bestimmen zu können. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei von einander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt worden sind.

	LB	1:10 LB	AUM
<i>P. aeruginosa</i> Stamm	MIC [ $\mu$ g/ml] Tobramycin		
PAO1	3,0 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,8
MH16	3,7 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 1,3
MH19	4,0 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,6
RN21	4,3 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,6
MH26	3,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 1,1
<i>P. aeruginosa</i> Stamm	MIC [ $\mu$ g/ml] Ciprofloxacin		
PAO1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1
MH16	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
MH19	1,0 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,8	0,6 $\pm$ 0,2
RN21	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1
MH26	1,0 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,1

Diese unterschiedliche Wirksamkeit ist anhand der Wirkmechanismen der Antibiotika zu erklären. Das Aminoglykosid-Antibiotikum Tobramycin hemmt die 30S Untereinheit der Ribosomen und damit die Proteinbiosynthese der Bakterien. Im Vollmedium (LB) stehen den Zellen die meisten Nährstoffe, wie Aminosäuren und Vitamine in größerer Menge zur Verfügung, als im Minimalmedium (1:10 LB). Es wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* unter diesen Mangelbedingungen nach etwa 20 h eine erhöhte Proteinbiosyntheserate besitzt (pers. Mitteilung, Wöhl). Dies macht die Bakterienzellen anfälliger für ein Aminoglykosid, dessen Angriffsort die Proteinbiosynthese ist. Entsprechend ist eine niedrigere Tobramycin-Konzentration erforderlich um ihr Wachstum zu inhibieren.

Des Weiteren binden die meist positiv geladenen Aminoglykoside an das negativ geladene extrazelluläre Polysaccharid Alginate (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988) und werden durch diese Bindung daran gehindert in die *P. aeruginosa*-Zelle einzudringen. Dieses Exopolysaccharid wird von *P. aeruginosa* im Vollmedium in wesentlich höheren Konzentrationen produziert als es in einem Mangelmedium der Fall

ist (Evans und Linker, 1973). Daher ist davon auszugehen, dass während der MIC-Bestimmungen in LB-Medium ein größerer Teil des zugegebenen Tobramycins Wechselwirkungen mit Alginat einging, als dies in 1:10 LB-Medium der Fall war. Daher musste in LB-Medium eine höhere Konzentration zur Inhibierung der Zellen eingesetzt werden.

Die Wirkungsweise des Gyrase-hemmenden Fluorchinolons Ciprofloxacin schien nicht derartig stark vom geringeren Nährstoffgehalt des 1:10 verdünnten LB-Mediums beeinflusst zu werden. Die MIC-Werte aller getesteten klinischen Isolate und des Laborstammes *P. aeruginosa* PAO1 waren sich in LB-Medium und 1:10 LB-Medium sehr ähnlich. Dies könnte damit zusammenhängen, dass sich *P. aeruginosa* zum Zeitpunkt der MIC-Bestimmungen (nach 18 h) in beiden Medien bereits in der Stationärphase befand. In dieser Wachstumsphase ist die Zahl der sich replizierenden Zellen unter beiden Bedingungen gleichermaßen gering und somit die Wirksamkeit des Gyrasehemmers Ciprofloxacin auf die Bakterienzellen in 1:10 LB-Medium und AUM vergleichbar.

Die MIC-Werte in AUM allerdings, dessen Wachstumsraten mit denen vergleichbar sind, die von *P. aeruginosa* in 1:10 LB-Medium erreicht werden (Rosin, 2011), waren für beide Antibiotika vergleichbar mit den MIC-Werten in LB-Medium oder höher. Die Nährstoffzusammensetzung des AUMs, die die Bedingungen während einer Harnwegsinfektion simuliert, verringerte offenbar die Antibiotikaempfindlichkeit von *P. aeruginosa* deutlich. Betrachtet man die ermittelten MICs beider Antibiotika in 1:10 LB und AUM vergleichend, so fällt auf, dass sich die Antibiotikaempfindlichkeit unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen gegenüber Tobramycin ca. 4-fach und gegenüber Ciprofloxacin ca. 3-fach verringerte. Die Stabilität beider Antibiotika über die gesamte Dauer der Experimente in 1:10 LB Medium und AUM wurde in einem Kontrollexperiment nachgewiesen (Kapitel 3.2.1). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es die spezielle Nährstoffzusammensetzung innerhalb des AUM ist, die diese erhöhte Antibiotikatoleranz unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen verursacht. Schon früher wurde die Beobachtung gemacht, dass die Nährstoffzusammensetzung des Mediums die Antibiotikatoleranz von Bakterien beeinflusst (Andrews, 2001). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich die Antibiotikatoleranz von *E. coli* unter Nährstoffmangelbedingungen und Hungerstress erhöht (Andrews, 2001).

Desweiteren zeigten zwei der getesteten Harnwegs isolate (MH16 und MH26) im Vergleich zum Laborstamm *P. aeruginosa* PAO1 eine erhöhte Toleranz gegenüber Tobramycin in AUM, obwohl in den bioMérieux-Resistenztest kein Unterschied zum Laborstamm zu erkennen gewesen ist (Kapitel 3.1). Dies deutet auf eine Adaptation der Stämme an die Bedingungen im Harntrakt hin, die möglicherweise auf metabolischer oder regulatorischer Ebene abläuft.

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die standardisierten Testbedingungen, die in der Medizin für Antibiogramme verwendet werden, die tatsächliche Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* unter Infektions-relevanten Bedingungen nicht wiedergeben. Die Bedeutung eines, den Infektionsbedingungen möglichst ähnlichen, Testmediums wird hier deutlich.

### **3.2.3. Antibiotikasensitivität von *P. aeruginosa*-Harnwegs isolaten auf Agarnährmedium**

Neben der speziellen Nährstoffsituation im Harnweg, bedingt die Physiologie von Harnwegsinfektionen ein Wachstum der pathogenen Bakterien als Biofilm. Es ist bekannt, dass *P. aeruginosa* unter diesen Bedingungen eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika aufweist (Hill *et al.*, 2005). In Tabelle 9 sind die Ergebnisse von MIC-Bestimmungen zusammengefasst, die mit Biofilmen durchgeführt worden sind (Kapitel 2.5.7).

Die Empfindlichkeit der *P. aeruginosa* Stämme gegenüber Tobramycin und Ciprofloxacin war während des Biofilmwachstums (Tabelle 9) um das zehnfache reduziert, verglichen mit den MIC-Werten planktonischer Kulturen (Tabelle 8). In der Literatur werden verschiedene Begründungen für diese erhöhte Antibiotikatoleranz während des Biofilmwachstums von *P. aeruginosa* diskutiert. Mah und O'Toole postulierten 2001 als Hauptgründe für die erhöhte Antibiotikatoleranz eines Biofilms, das langsamere Wachstum der beteiligten Zellen, eine RpoS-vermittelte Stressantwort und einen biofilmspezifischen Phänotyp von *P. aeruginosa* (Mah und O'Toole, 2001).

**Tabelle 9:** Antibiotikasensitivität von Biofilmen der *P. aeruginosa* Harnwegs isolate und des Laborstammes PAO1 gegenüber Tobramycin und Ciprofloxacin. Die Biofilme wurden aerob auf Nähragarplatten verschiedener Medien angezogen, um die MICs auf Inhibierungstest-Platten nach 18 h  $\pm$  2 h bei 37 °C bestimmen zu können. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei von einander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt worden sind.

	LB	1:10 LB	AUM
<i>P. aeruginosa</i> Stamm	MIC [ $\mu$ g/ml] Tobramycin		
PAO1	35,0 $\pm$ 3,8	54,0 $\pm$ 5,0	77,0 $\pm$ 5,2
MH16	88,0 $\pm$ 5,0	89,0 $\pm$ 7,4	152,0 $\pm$ 4,1
MH19	44,0 $\pm$ 4,4	60,0 $\pm$ 9,4	82,0 $\pm$ 7,0
RN21	38,0 $\pm$ 4,1	80,0 $\pm$ 0,0	80,0 $\pm$ 0,0
MH26	85,0 $\pm$ 5,8	95,0 $\pm$ 5,8	83,0 $\pm$ 5,2
<i>P. aeruginosa</i> Stamm	MIC [ $\mu$ g/ml] Ciprofloxacin		
PAO1	6,0 $\pm$ 0,8	15,0 $\pm$ 1,1	15,0 $\pm$ 1,1
MH16	3,0 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 1,0
MH19	4,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 0,8
RN21	6,0 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 1,7	10,0 $\pm$ 1,9
MH26	4,0 $\pm$ 0,8	14,0 $\pm$ 1,3	11,0 $\pm$ 1,1

Transkriptomanalysen mittels DNA-Mikroarrays von *P. aeruginosa* zeigten, dass in Biofilmen vor allem Gene, die an einer veränderten Resistenzeigenschaft gegenüber antimikrobiellen Agenzien, wie z. B. Antibiotika und Desinfektionsmitteln beteiligt sind, einen erhöhten Expressionslevel besitzen (Whiteley *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression des Gens, welches für den alternativen Sigmafaktor RpoS kodiert im Biofilm nachgewiesen (Heydorn *et al.*, 2002). Dieser spielt eine große Rolle bei der Stressantwort des Bakteriums (Jorgensen *et al.*, 1999) und wird auch von planktonischen Zellen beim Eintritt in die Stationärphase exprimiert (Whiteley *et al.*, 2001). Bekannterweise sind stationäre Kulturen stets resistenter gegenüber Antibiotika (Heydorn *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen einen anderen physiologischen Zustand aufweisen, der eine erhöhte Stresstoleranz und Resistenzeigenschaft zur Folge hat (Boriello *et al.*, 2004). Mittels Proteomanalyse über 2D-Gelelektrophorese wurde nachgewiesen, dass im Biofilm lebende Bakterien im Vergleich zu planktonischen Zellen auch ein stark verändertes Proteinmuster aufweisen (Sauer *et al.*, 2002). Außerdem vermuteten Mah und O'Toole weitere Ursachen in der physikalischen und



chemischen Struktur der Exopolysaccharide oder andere Besonderheiten der Biofilm-Architektur, die das Eindringen der Antibiotika in den Biofilm verhindern würden (Mah und O'Toole, 2001a). Eine weitere Rolle könnte das von *P. aeruginosa* produzierte Exopolysaccharid Alginat spielen, welches z. B. Aminoglykoside bindet und auch mit anderen Antibiotika Wechselwirkungen eingehen kann, was letztlich die Diffusion der Wirkstoffe durch den Biofilm behindern könnte (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988).

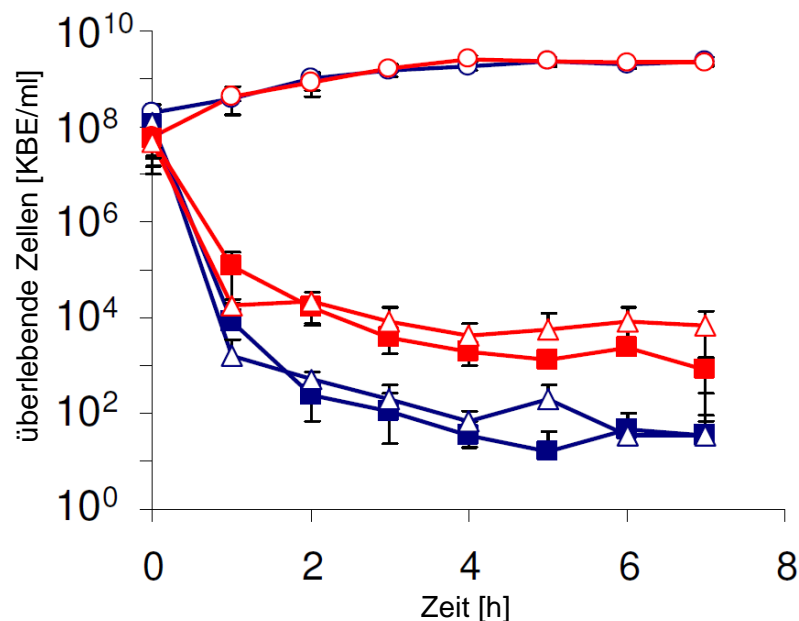
Die Struktur eines Biofilms scheint darüber hinaus Einfluss auf die Antibiotika-Resistenz zu haben. Boriello *et al.* zeigten 2004, dass sich in dessen Inneren mikroaerobe bis anaerobe Zonen befinden (Boriello *et al.*, 2004). Der Luftsauerstoff dringt nur etwa 50 µm bis 90 µm in den Biofilm ein und wird zudem durch stoffwechselaktive Zellen veratmet, die Zellen, die sich tiefer innerhalb der dreidimensionalen Struktur befinden, stellen ihren Stoffwechsel auf anaerobes Wachstum ein (Marshall *et al.*, 2002). Boriello *et al.* beschrieben dies als wichtigen Faktor der erhöhten Antibiotikateranz (Boriello *et al.*, 2004). Das Vorhandensein von Arginin und Nitrat erhöht zusätzlich die Antibiotikateranz unter anaeroben Bedingungen (Borriello *et al.*, 2006).

Neben diesen Biofilm-spezifischen Effekten konnte, wie auch schon während der MIC-Bestimmungen planktonischer Kulturen (Kapitel 3.2.2), beobachtet werden, dass das Wachstum auf AUM im Vergleich zu LB-Medium die Antibiotikateranz der getesteten Stämme erhöht (Tabelle 9). Allerdings ergaben sich auf 1:10 LB und AUM, anders als in Flüssigkulturen, ganz ähnliche MICs. Dies könnte in der für Biofilmzellen beschriebenen geringeren metabolischen Aktivität begründet sein (Anwar *et al.*, 1992). Dieser besondere physiologische Status der Biofilmzellen führt möglicherweise zu dem beobachteten geringeren Einfluss der Nährstoffzusammensetzung auf die Antibiotikateranz. Außerdem zeigten diese Ergebnisse deutlich, dass fast alle der getesteten Harnwegs isolate, verglichen mit dem *P. aeruginosa* PAO1 Laborstamm eine erhöhte Tobramycin-Toleranz aufwiesen. Das *P. aeruginosa* Isolat MH16 erwies sich während der MIC-Bestimmungen im Biofilm als besonders Tobramycin-resistent, obwohl während des bioMérieux-Screenings keine erhöhte Toleranz nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.1). Es ist scheinbar gut an die Bedingungen angepasst, die während einer Infektion im Harnweg von den Bakterien vorgefunden werden. Diese stammspezifischen Abweichungen in der Antibiotikateranz wurden bereits an anderer Stelle für *P. aeruginosa* beschrieben (Henwood *et al.*, 2001).

### 3.3. Zeitabhängigkeit der Wirksamkeit einer Antibiotika-Behandlung

Neben Stamm-spezifischer Anpassung an das Leben im Harnweg während einer Infektion sollte auch untersucht werden ob die Wachstumsphase der Bakterien Einfluss auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* hat. Zu Beginn einer Harnwegsinfektion bewegen sich planktonisch lebende Bakterien durch die Urethra hinauf zur Blase, sie adherieren an das Schleimhautgewebe und entwickeln schließlich einen Biofilm wie in Kapitel 1.2 beschrieben (Tenke *et al.*, 2006).

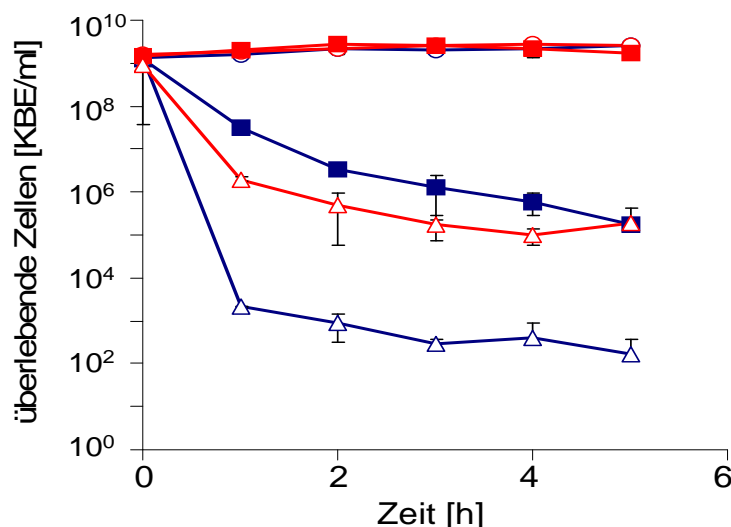
Zur Untersuchung der Effizienz der Antibiotika-Behandlung einer Harnwegsinfektion während eines frühen Stadiums, wurden Absterbeversuche mit *P. aeruginosa* PAO1 Zellen in exponentieller Wachstumsphase durchgeführt. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.5.8 beschrieben, planktonische Kulturen in logarithmischer Wachstumsphase (nach 1,5 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (15,0 µg/ml) und Ciprofloxacin (1,5 µg/ml) in 1:10 LB-Medium und AUM behandelt. Zur Dokumentation des Absterbeverhaltens wurde neben der OD<sub>578 nm</sub> auch die Anzahl der überlebenden Zellen [KBE/ml] bestimmt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* PAO1. Planktonische Kulturen wurden in 1:10 LB (blau) und AUM (rot) bis in die exponentielle Wachstumsphase hinein (1,5 h) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bevor sie der 5-fachen MIC Tobramycin (■) oder Ciprofloxacin (Δ) inkubiert wurden. Unbehandelte Kulturen (O) dienten als Negativkontrolle zum Vergleich.

Wie die Ergebnisse zeigen starben die meisten Zellen der *P. aeruginosa* Kulturen in logarithmischer Wachstumsphase sofort nach der Zugabe des Antibiotikums ab. Die stärkste Abnahme lebender Zellen fand in beiden Medien und unter Einfluss beider Antibiotika innerhalb der ersten 60 min statt. Allerdings war weder Tobramycin noch Ciprofloxacin in der Lage 100 % der eingesetzten *P. aeruginosa* Zellen innerhalb von 7 h abzutöten. Desweiteren war eine Antibiotikabehandlung unter Laborbedingungen (in 1:10 LB-Medium) deutlich effektiver, als es unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen (in AUM) der Fall war. Während in 1:10 LB-Medium ca.  $1 \times 10^1$  KBE/ml überlebten, blieben in AUM ca.  $1 \times 10^4$  KBE/ml vital. Bei diesen überlebenden Zellen könnte es sich um sogenannte Persisterzellen handeln, die als Subpopulation dormant in der Bakterienkultur verbleiben und aufgrund ihres nahezu inaktiven Metabolismus eine besonders hohe Antibiotikatoleranz aufweisen (Lewis, 2007). Für die Persisterzellbildung während des Absterbens einer Bakterienkultur ist das hier sichtbare biphasische Absterbeverhalten bereits beschrieben (Kim und Wood, 2009). Für *E. coli* ist eine Persisterzellbildung von ca.  $1 \times 10^3$  Persisterzellen/ml Kultur bekannt (Kim und Wood, 2009). Es wurde beschrieben, dass der Anteil der Persisterzellen in Kulturen von *P. aeruginosa* zwar geringer ist, als der in Kulturen von *E. coli* oder *Staphylococcus aureus*, durchaus aber ausreicht um das Überleben von *P. aeruginosa* während einer Antibiotikabehandlung einer chronischen Infektion zu sichern (Möker *et al.*, 2010). Der Mechanismus welcher zur Dormanz der Persisterzellen und zur „Wiederbelebung“ nach Beendigung der Antibiotikabehandlung führt ist noch weitgehend unbekannt (Möker *et al.*, 2010). Auch über eine möglicherweise erhöhte Persisterzellbildung unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen ist bisher nichts bekannt. *P. aeruginosa*, der in beiden Medien vergleichbare Wachstumsraten zeigte, wies eine deutlich erhöhte Antibiotikatoleranz unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen auf.

Da die antibiotische Behandlung einer Harnwesinfektion zumeist erst begonnen wird, sobald Symptome dem betroffenen Patienten Beschwerden bereiten, sollte auch ein solcher Infektionszeitpunkt in Absterbekurven simuliert werden. Zu diesem Zeitpunkt werden mind.  $10^5$  Zellen/ml Urin als Marker für eine Infektion nachgewiesen. Es wurde daher die Antibiotikaempfindlichkeit von *P. aeruginosa* PAO1-Kulturen in Stationärphase untersucht. Für diese Experimente wurden, wie in Kapitel 2.5.8 beschrieben PAO1-Kulturen bis in die Stationärphase hinein (4 h) inkubiert und anschließend wie beschrieben mit Antibiotikum (5 x MIC) behandelt.

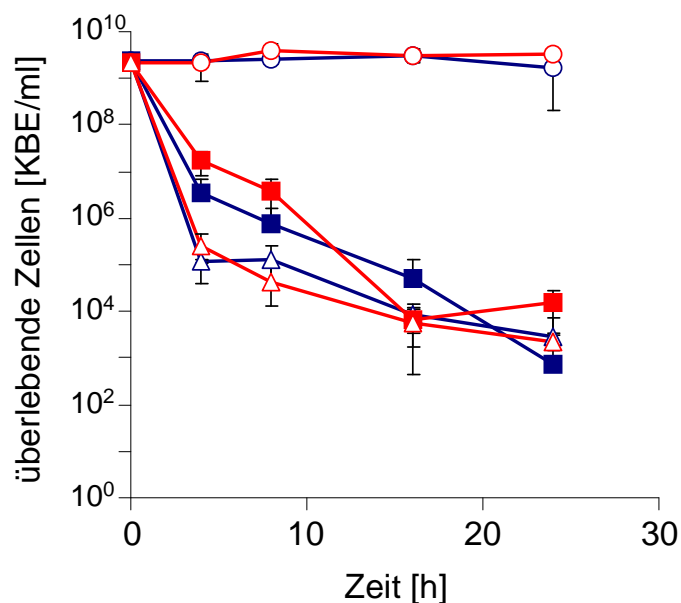


**Abbildung 6:** Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* PAO1. Planktonische Kulturen wurden in 1:10 LB (blau) und AUM (rot) bis in die Stationärphase hinein (4 h) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bevor sie der 5-fachen MIC Tobramycin (■) oder Ciprofloxacin (Δ) inkubiert wurden. Unbehandelte Kulturen (O) dienten als Negativkontrolle zum Vergleich.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt und zeigen den Unterschied zur Behandlung von Kulturen in exponentieller Wachstumsphase (Abbildung 5). Wie erwartet war die Antibiotikaempfindlichkeit von *P. aeruginosa* unter diesen Bedingungen deutlich reduziert. Interessanterweise wurde ebenfalls eine starke Medienabhängigkeit der Antibiotikatoleranz festgestellt (Abbildung 6). Der Laborstamm PAO1 zeigte sich unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen gegenüber beiden Antibiotika weniger empfindlich als im Vergleichsmedium 1:10 LB. Der Einfluss des Nährmediums war unter diesen Bedingungen sogar noch größer als zuvor. Im Gegensatz zu den Kulturen in exponentieller Wachstumsphase, zeigten sich die Stationärphase-Kulturen gegenüber Ciprofloxacin deutlich empfindlicher als gegenüber Tobramycin. Der Unterschied zwischen beiden Antibiotika, die auf *P. aeruginosa* Zellen in exponentieller Wachstumsphase eine vergleichbare Wirksamkeit gezeigt hatten, war hier beträchtlich. Tatsächlich konnten die *P. aeruginosa*-Zellen unter diesen Bedingungen nicht durch die Zugabe von Tobramycin abgetötet werden. Diese hohe Rate an überlebenden Zellen (~100 %) kann nicht allein mit dem Auftreten von Persisterzellen erklärt werden. Sie nehmen beispielsweise in *E. coli* Kulturen einen maximalen Anteil von ca. 1 % der

Population ein und sind auch für Populationen von *P. aeruginosa* als begrenzt beschrieben (Lewis, 2007). Möglicherweise ist dieses Phänomen mit dem Wirkmechanismus von Tobramycin zu begründen, welches eine Hemmung der Proteinbiosynthese zur Folge hat. Wie bereits in Kapitel 3.2.2 erläutert wirkt das Aminoglykosid besonders stark auf Stoffwechselaktive Zellen. Der inaktive Stoffwechsel der hier untersuchten Zellen in Stationärphase verringerte damit möglicherweise die Wirksamkeit des Tobramycins.

Ein noch späterer Behandlungsbeginn einer Harnwegsinfektion ermöglicht *P. aeruginosa* schließlich die Bildung von Biofilmen bevor die Antibiotikagabe erfolgt. Daher wurde auch das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa*-Biofilmen in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.5.10 beschrieben Filterbiofilme bis zum Beginn der Stationärphase inkubiert und anschließend der 10-fachen MIC Tobramycin (30 µg/ml) oder Ciprofloxacin (3 µg/ml) ausgesetzt. Als Vergleich dienten die Zellzahlen unbehandelter Biofilme. Die Zahl der überlebenden Zellen [KBE/ml] ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7:** Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* PAO1. Biofilme wurden auf 1:10 LB (blau) und AUM (rot) bis in die Stationärphase hinein (24 h) bei 37 °C inkubiert, bevor sie der 10-fachen MIC Tobramycin (■) oder Ciprofloxacin (Δ) inkubiert wurden. Unbehandelte Biofilme (O) dienen als Negativkontrolle zum Vergleich.

Wie erwartet zeigten die Biofilme, verglichen mit Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 5), eine erhöhte Antibiotikatoleranz. Obwohl sie mit einer doppelt so hohen Antibiotikakonzentration (10-fache MIC) behandelt worden waren überlebten ca  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  KBE/ml die 24 stündige Antibiotikabehandlung. Interessanterweise war auch diesmal, wie schon bei den MIC-Bestimmungen von Biofilmen (Kapitel 3.2.3) kein Unterschied zwischen den beiden Nährmedien zu erkennen. Die Wirksamkeit beider Antibiotika war von der Harnwegs-spezifischen Nährstoffsituation in diesem Fall nicht beeinträchtigt. Die Erklärung hierfür liefert der physiologische Status der Biofilmzellen. Ihre geringe metabolische Aktivität (Anwar *et al.*, 1992) könnte dazu führen, dass die Nährstoffzusammensetzung des Mediums einen geringeren Einfluss auf die Antibiotikatoleranz hat. Das verlangsamte Absterbeverhalten der Biofilmzellen ähnelt dem Verhalten der zuvor getesteten Zellen in Stationärphase, die einen vergleichbaren, langsamer wachsenden Phänotyp aufweisen (Spoering und Lewis, 2001). Allerdings schienen die behandelten Biofilme im Vergleich zu Stationärphase-Kulturen empfindlicher auf die getesteten Antibiotika zu reagieren. Spoering und Lewis beschrieben die höhere Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* Stationärphase-Kulturen als einen Effekt der Persisterzellbildung, die innerhalb von Biofilmen einen geringeren Einfluss hat (Spoering und Lewis, 2001). Sie zeigten, dass *P. aeruginosa*-Kulturen innerhalb der Stationärphase die größte Persisterzell-Rate besitzen, während sich innerhalb von Biofilmen etwas weniger Persisterzellen befinden und ihr Anteil in logarithmischen Kulturen verschwindend gering ( $< 0,001$  %) ist (Spoering und Lewis, 2001). Die hier gezeigten Absterbekurven stimmen mit diesen Erkenntnissen überein, der biphasische Verlauf (Abbildung 5 und 6) ließ sich unter Biofilmbedingungen nicht mehr so deutlich erkennen (Abbildung 7).

Zusammengefasst machen diese Ergebnisse deutlich, dass der Zeitpunkt, an dem die antibiotische Behandlung einer Harnwesinfektion begonnen wird, einen bedeutenden Einfluss auf die Wirksamkeit der eingesetzten Antibiotika hat. Es scheint nur ein schmales Zeitfenster für eine effiziente Antibiotikatherapie von *P. aeruginosa*-Infektionen zu existieren.

### 3.4. Sauerstoffabhängigkeit der Antibiotikateranz von *P. aeruginosa*

Eine weitere Bedingung, die *P. aeruginosa* innerhalb des Harnwegs vorfindet, ist die begrenzte Sauerstoffverfügbarkeit. Der menschliche Harnweg stellt eine Sauerstoff-limitierte Umgebung dar (Giannakopoulos *et al.*, 1997). Desweiteren enthalten Biofilme, die *P. aeruginosa* bildet, mikroaerobe und anaerobe Zonen in tieferen Schichten, aufgrund der Veratmung von Sauerstoff durch die dort lebenden Zellen (Boriello *et al.*, 2004). Daher wurde der Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit auf die Antibiotikateranz von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.5.10 beschrieben, die Überlebensraten von *P. aeruginosa*-Biofilmen unter aeroben und anaeroben Bedingungen auf AUM und zum Vergleich auf 1:10 LB-Medium dokumentiert (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Absterberaten von *P. aeruginosa* PAO1 Filterbiofilmen nach Antibiotikabehandlung. Nach dem Wachstum der Filterbiofilme für 24 h, 37 °C auf 1:10 LB-Medium oder AUM unter aeroben und anaeroben Bedingungen, wurden diese mit der 10-fachen MIC Tobramycin oder Ciprofloxacin im Agarnährmedium für weitere 12 h (aerob) bzw. 3-4 Tage (anaerob) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. In Klammern sind die Überlebensraten in Prozent angegeben.

Bedingung	überlebende Zellen [KBE/ml]			
	1:10 LB-Medium		AUM	
	Tobramycin	Ciprofloxacin	Tobramycin	Ciprofloxacin
aerob	1,07 x 10 <sup>4</sup> (0,0002)	3,47 x 10 <sup>5</sup> (0,0051)	1,88 x 10 <sup>4</sup> (0,0004)	1,21 x 10 <sup>4</sup> (0,0003)
anaerob	4,24 x 10 <sup>7</sup> (0,46)	8,04 x 10 <sup>7</sup> (0,87)	1,21 x 10 <sup>8</sup> (2,84)	4,98 x 10 <sup>7</sup> (1,17)

Es konnte klar gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Sauerstoff die Antibiotikateranz von *P. aeruginosa*, sowohl gegenüber Tobramycin als auch gegenüber Ciprofloxacin deutlich erhöht. Während die Lebendzellzahlen von unbehandelten Filterbiofilmen unter allen getesteten Bedingungen vergleichbar waren (7,7 x 10<sup>9</sup> KBE/ml), stiegen die Überlebensraten der anaerob kultivierten PAO1 Biofilme zwischen 170-fach (Ciprofloxacin auf 1:10 LB) und 7100-fach (Tobramycin auf AUM) verglichen mit aerob kultivierten Biofilmen. Dies weist auf eine

Sauerstoffabhängigkeit der Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* Biofilmen hin. Es wurde bereits beschrieben, dass der anaerobe Metabolismus die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* erhöht (Boriello *et al.*, 2004) und dass Intermediate der Nitratatmung wie z. B. NO die Antibiotikatoleranz beeinflussen (Hassett *et al.*, 2002). Die Nitratkonzentration im menschlichen Urin ist diätabhängig und schwankt zwischen 0,1 und 1,0 mM (Ellis *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997; Egberts und Soenderhuizen, 1996) und auch NO ist in diesem Habitat zu finden (Wang *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass Nitratkonzentrationen über 0,4 mM das anaerobe Wachstum und die Denitrifikation fördern (Palmer *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde daher den Nährmedien zur Anzucht unter anaeroben Bedingungen Nitrat zugesetzt (Kapitel 2.5.4).

Ein weiterer Grund für die Schwierigkeit der Behandlung einer durch *P. aeruginosa* verursachten Harnwegsinfektion ist, dass nicht die Gesamtdosis oral verabreichter Antibiotika die infizierten Gewebe erreicht. Die empfohlene Tagesdosis für Ciprofloxacin beispielsweise beträgt 1 bis 2 x täglich 100-500 mg (van Poppel *et al.*, 1988). Mit einer Bioverfügbarkeit im Urin von 40 % bis 80 % (Davis *et al.*, 1985), liegt die erreichte Konzentration wirksamen Ciprofloxacins im Harnweg bei 0,03 mg/ml bis 0,57 mg/ml bei einer durchschnittlichen Tagesurinmenge von 1,4 l/Tag. Die für *P. aeruginosa* PAO1 bestimmte MIC unter Standardbedingungen liegt mit 0,0003 mg/ml (Kapitel 3.2.2) deutlich darunter. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die von *P. aeruginosa* im Harnweg vorgefundenen Bedingungen dessen Antibiotikatoleranz dramatisch erhöhen. Die durch das verwendete AUM imitierte Nährstoffzusammensetzung des Urins erhöhte die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* 2-fach. Das außerdem im Harntrakt einsetzende Biofilmwachstum erhöhte die Antibiotikatoleranz nochmals um das 10-Fache. Der im Harnweg herrschende Sauerstoffmangel hatte hierbei den deutlichsten Effekt auf die Antibiotikatoleranz und erhöhte diese gegenüber Ciprofloxacin um das 195-Fache auf 58,5 mg/ml. Dies entspricht dem 100-fachen der im Urin während einer Behandlung erreichten Konzentration des Wirkstoffes bei maximaler oraler Behandlungsdosis. Gegenüber Tobramycin steigt die MIC der *P. aeruginosa* PAO1-Biofilme unter anaeroben Bedingungen auf AUM sogar auf 547 mg/ml, was 1000-fach höher ist als dessen wirksame Konzentration im Urin. Zusammen mit der erhöhten Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa*-Harnwegsisolaten und der steigenden Anzahl von multiresistenten Stämmen kann von einer unzureichenden antibiotischen Behandlung von



Harnwegsinfektionen mit *P. aeruginosa* ausgegangen werden. Es ist daher nötig neue Strategien für die Antibiotikabehandlung, wie Kombinationen verschiedener Wirkstoffe oder neue Medikamente, die an anderer Stelle in den Zellmetabolismus eingreifen, zu entwickeln.

Insgesamt machen diese Ergebnisse deutlich, wie unzureichend bisherige Testmethoden die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* wiedergeben konnten. Das hier verwendete *in vitro*-System, welches die Bedingungen im Inneren des menschlichen Harntraktes simuliert, sollte daher im Folgenden für die Erforschung der Antibiotikaresistenz-Mechanismen von *P. aeruginosa* unter Infektions-relevanten Bedingungen verwendet werden.

### **3.5. Antibiotikaresistenz-Mechanismen von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-relevanten Bedingungen**

Wie bereits gezeigt wurde, haben die Nährstoffzusammensetzung des AUM, welches Harnwegs-ähnliche Bedingungen simuliert, und die Physiologie von *P. aeruginosa* innerhalb des Harnwegs einen deutlichen Einfluss auf dessen Antibiotikaempfindlichkeit. Nun galt es die Frage zu klären welche Mechanismen diesem Phänomen zugrunde liegen.

Während vorangegangener Proteomanalysen von Antibiotika-behandelten *P. aeruginosa* Biofilmen, konnten 43 Proteine identifiziert werden (Narten, 2009). Davon standen vier möglicherweise im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzmechanismen und wurden für weitere Experimente ausgewählt. Nach einer Inkubation von Filterbiofilmen auf 1:10 LB- und AUM-Agarnährmedium mit sublethalen Dosen (1/5 MIC) der Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin wurde das Proteom der Biofilmzellen über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Auffällige Proteine wurden mittels MALDI-TOF identifiziert und konnten mit Medien- oder Antibiotika-spezifischen Effekten in Verbindung gebracht werden. Diese Proteine sollten in dieser Arbeit näher untersucht werden um ihren Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* festzustellen. Sie sind in Tabelle 11 aufgelistet und werden in den folgenden

Kapiteln eingehender behandelt. Es wurden Transposonmutanten der entsprechenden kodierenden Gene charakterisiert.

**Tabelle 11:** Proteine, die bei einer Proteomanalyse mit *P. aeruginosa* Biofilmen, aufgefallen waren. Die Biofilme waren auf 1:10 LB und AUM, mit und ohne Antibiotika (Tobramycin oder Ciprofloxacin), gewachsen.

Protein	PA-Nummer	Bedingung	Funktion
AlgR	PA5261	Hochreguliert in Biofilmen, die auf 1:10 LB gewachsen sind	Regulator der Alginatbiosynthese
SpuE	PA0301	Hochreguliert unter Tobramycin Einfluss	Polyamintransport-Protein
FumC1	PA4470	Hochreguliert in Biofilmen, die auf AUM gewachsen sind	Fumarathydratase (Zitratzyklus)
SodM	PA4468	Hochreguliert in Biofilmen, die auf AUM gewachsen sind	Superoxiddismutase

### 3.5.1. Wachstumsraten potentiell antibiotikaresistenter *P. aeruginosa*-Transposonmutanten

Um auszuschließen, dass eventuelle Antibiotikaresistenzen der Transposonmutanten von einem, vom Wildtyp abweichenden Wachstumsphänotyp herrühren, wurde zunächst das Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 $\Delta$ *fumC1*, PAO1 $\Delta$ *algR* und PAO1 $\Delta$ *spuE* in 1:10 LB und AUM bestimmt. Die Ergebnisse der angefertigten Wachstumskurven sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Wuchsraten, die maximal erreichte Zellzahl, sowie auch der Zeitpunkt zu dem die getesteten Stämme in die Stationärphase eintraten, waren für alle drei Transposonmutanten und für den *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 nahezu identisch. Damit wurde gezeigt, dass keine der getesteten Transposonmutanten einen auffälligen Wachstumsphänotyp aufwies.

**Tabelle 12:** Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 und den Transposonmutanten PAO1 $\Delta$ *fumC1*, PAO1 $\Delta$ *algR* und PAO1 $\Delta$ *spuE* in AUM, aerob bei 37 °C und 200 rpm. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei von einander unabhängigen Experimenten.

<i>P. aeruginosa</i> -			
Stamm	Wuchsrate $\mu$	max. KBE/ml	erreicht nach [h]
1:10 LB			
PAO1	0,9	$2,4 \times 10^9$	7
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	0,7	$2,4 \times 10^9$	7
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	0,6	$2,0 \times 10^9$	7
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	0,8	$2,3 \times 10^9$	6
AUM			
PAO1	0,7	$2,7 \times 10^9$	4
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	0,9	$2,3 \times 10^9$	7
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	1,0	$2,0 \times 10^9$	7
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	1,3	$2,0 \times 10^9$	5

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsraten der getesteten *P. aeruginosa* Stämme in 1:10 LB-Medium und AUM vergleichbar waren (Tabelle 12). Das 1:10 verdünnte LB-Medium als Standardmedium eignet sich also aufgrund der vergleichbaren Wuchsraten gut als Referenzmedium zum AUM.

### 3.5.2. Antibiotikasensitivität von *P. aeruginosa*-Transposonmutanten in Flüssignährmedium

Die MICs der ausgewählten Transposonmutanten von Tobramycin und Ciprofloxacin wurden bestimmt, um zu überprüfen ob sich ihre Antibiotikatoleranz von der des Wildtyps *P. aeruginosa* PAO1 unterscheidet. Wie die Harnwegs isolate (Kapitel 3.2.2), wurden auch die Transposonmutanten sowohl in LB-Komplexmedium, in 1:10 verdünntem LB und in AUM getestet.

**Tabelle 13:** Antibiotikasensitivität von Tobramycin and Ciprofloxacin des *P. aeruginosa* PAO1 und davon abgeleiteten Transposonmutanten. Die planktonischen Kulturen wurden in unterschiedlichen Medien aerob kultiviert, um nach 18 h  $\pm$  2 h bei 37 °C und 350 rpm die MIC bestimmen zu können. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei von einander unabhängigen Messungen.

	LB	1:10 LB	AUM
<i>P. aeruginosa</i> Stämme			
	MIC [ $\mu$ g/ml] Tobramycin		
PAO1	3,0 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,8
PAO1 $\Delta$ fumC1	2,8 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,5
PAO1 $\Delta$ algR	3,0 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,6
PAO1 $\Delta$ spuE	4,3 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,6
<i>P. aeruginosa</i> Stämme			
	MIC [ $\mu$ g/ml] Ciprofloxacin		
PAO1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1
PAO1 $\Delta$ fumC1	0,4 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
PAO1 $\Delta$ algR	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1
PAO1 $\Delta$ spuE	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1

Wie in Tabelle 13 zu sehen, verhielten sich die getesteten Transposonmutanten während der MIC-Bestimmungen in Flüssigmedium wie der Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1. Einzig die PAO1 $\Delta$ spuE Transposonmutante zeigte sich während der MIC-Bestimmungen in LB-Medium leicht Tobramycin-toleranter. Da sich diese Tendenz allerdings nicht in den anderen Nährmedien bestätigen ließ und die Standardabweichung mit 0,8 (18,6 %) in diesem Fall relativ hoch war, konnte dies kein eindeutiger Hinweis auf eine veränderte Tobramycin-Resistenz der PAO1 $\Delta$ spuE Transposonmutante sein.

Wie bereits in Kapitel 3.2.2 am Beispiel der *P. aeruginosa* Harnwegs isolate erläutert zeigten auch die getesteten Transposonmutanten eine, im Vergleich zum LB-Komplexmedium, verringerte Tobramycin-Toleranz in 1:10 LB. Wie beim Wildtyp ist dies mit der im 1:10 LB – Minimalmedium erhöhten Proteinbiosyntheserate zu erklären, die die Zellen für Aminoglykosidantibiotika anfälliger macht. Auch in AUM und gegenüber Ciprofloxacin verhielten sich alle getesteten Transposonmutanten wie der *P. aeruginosa* PAO1 Wildtypstamm. Während der MIC-Bestimmungen in Flüssigmedium zeigte also keines der mutierten Gene einen Einfluss auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa*.

### 3.5.3. Antibiotikasensitivität von *P. aeruginosa*-Transposonmutanten auf Agarnährmedium

Auch während des Biofilmwachstums auf Agarnährmedium wurden die MICs der Transposonmutanten vergleichend zu denen des *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyps ermittelt. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse dieser MIC-Bestimmungen zusammengefasst.

**Tabelle 14:** Antibiotikasensitivität von Tobramycin und Ciprofloxacin für Biofilme von *P. aeruginosa* PAO1 und davon abgeleiteten Transposonmutanten. Die Biofilme wurden aerob auf verschiedenen Nähragarplatten angezogen, um die MICs auf Inhibierungstest-Platten nach 18 h  $\pm$  2 h bei 37 °C bestimmen zu können. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mindestens drei von einander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt worden sind.

	LB	1:10 LB	AUM
<i>P. aeruginosa</i> -Stamm	MIC [ $\mu$ g/ml] Tobramycin		
PAO1	35,0 $\pm$ 3,8	54,0 $\pm$ 5,0	77,0 $\pm$ 5,2
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	31,0 $\pm$ 2,4	48,0 $\pm$ 12,8	61,0 $\pm$ 9,9
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	32,0 $\pm$ 4,1	55,0 $\pm$ 4,4	54,0 $\pm$ 4,0
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	45,0 $\pm$ 6,9	50,0 $\pm$ 3,0	73,0 $\pm$ 6,5
<i>P. aeruginosa</i> -Stamm	MIC [ $\mu$ g/ml] Ciprofloxacin		
PAO1	6,0 $\pm$ 0,8	15,0 $\pm$ 1,1	15,0 $\pm$ 1,1
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	7,0 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 2,4	13,0 $\pm$ 1,0
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	6,0 $\pm$ 0,0	12,0 $\pm$ 1,1	12,0 $\pm$ 1,1
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	5,0 $\pm$ 0,9	10,0 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 0,9

Auch während dieser MIC-Bestimmungen zeigte keine der getesteten Transposonmutanten einen Phänotyp, der bezüglich ihrer Antibiotikatoleranz von dem des PAO1 Wildtyps abwich. Genau wie beim PAO1 Wildtyp erhöhte sich während des Wachstums als Biofilm die Antibiotikatoleranz der Transposonmutanten etwa um das zehnfache im Vergleich zum planktonischen Wachstum (Kapitel 3.5.2). Die Erklärung für diesen Effekt ist bereits in Kapitel 3.2.3 eingehend erläutert und lässt sich zusammenfassend mit dem speziellen Phänotyp von Biofilmzellen und weiteren, physikalischen Eigenschaften der Biofilmstruktur erklären. Auch die Medieneffekte auf

die Antibiotikatoleranz der Transposonmutanten waren im Biofilm die gleichen, wie die, die bereits für den *P. aeruginosa* PAO1 Wildtypstamm beschrieben worden sind.

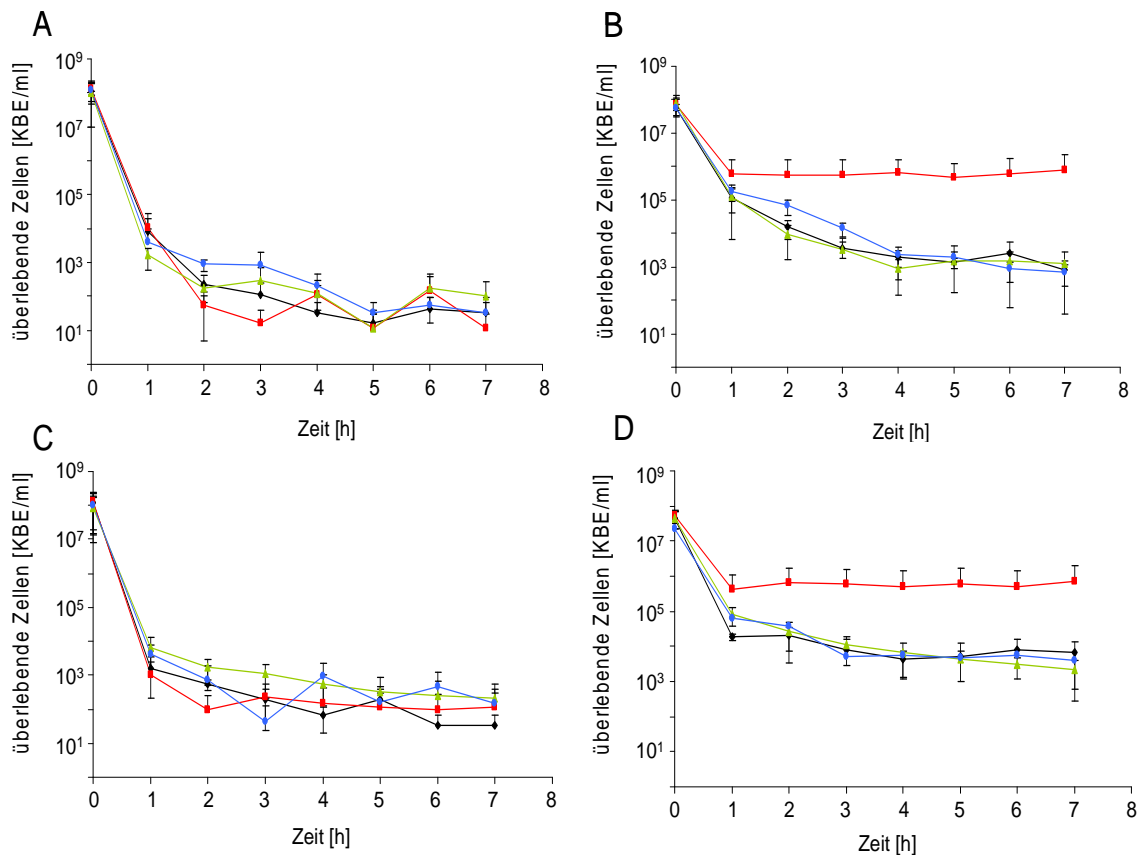
#### **3.5.4. Absterbeverhalten der *P. aeruginosa*-Transposonmutanten unter Antibiotika-Einwirkung**

Da sich das Verhalten der getesteten Transposonmutanten PAO1 $\Delta$ *fumC1*, PAO1 $\Delta$ *algR* und PAO1 $\Delta$ *spuE* während der MIC-Bestimmungen nicht wesentlich von dem des *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyps unterschied, sollte ihr Absterbeverhalten während der Inkubation mit höheren Antibiotikakonzentrationen genauer untersucht werden. Um wie für die Harnwegs-Isolate (Kapitel 3.3) die Effizienz einer Antibiotikabehandlung in verschiedenen Stadien der Harnwegsinfektion zu überprüfen, wurden sowohl planktonische Kulturen in logarithmischer und stationärer Wachstumsphase, als auch Biofilme mit Tobramycin und Ciprofloxacin behandelt

##### **3.5.4.1. Reaktion planktonischer *P. aeruginosa*-Kulturen während der logarithmischen Wachstumsphase auf Antibiotikabehandlung**

Zunächst wurden *P. aeruginosa*-Zellen, die sich in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden mit der 5-fachen MIC der Antibiotika Tobramycin (15,0 µg/ml) und Ciprofloxacin (1,5 µg/ml) in 1:10 LB-Medium und AUM behandelt. Zur Dokumentation des Absterbeverhaltens wurde neben der OD<sub>578 nm</sub> auch die Anzahl der überlebenden Zellen [KBE/ml] bestimmt.

In Abbildung 8 ist deutlich zu erkennen, dass die meisten Zellen der *P. aeruginosa* Kulturen sofort nach der Zugabe des Antibiotikums abstarben. Wie zuvor beim PAO1 Wildtyp beobachtet, fand die stärkste Abnahme lebender Zellen in beiden Medien und unter Einfluss beider Antibiotika innerhalb der ersten 60 min statt.



**Abbildung 8:** Wachstumsverhalten planktonischer Kulturen in 1:10 LB (A und C) und AUM (B und D), die während der logarithmischen Wachstumsphase (1,5 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (A und B) oder Ciprofloxacin (C und D) behandelt worden sind. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei von einander unabhängigen Experimenten. schwarz: PAO1, rot: PAO1 $\Delta$ fumC1, grün: PAO1 $\Delta$ algR, blau: PAO1 $\Delta$ spuE.

Betrachtet man die Abbildung 8A und 8C, die den Einfluss von Tobramycin und Ciprofloxacin auf Kulturen zeigen, die in 1:10 LB kultiviert worden sind, so fällt zunächst auf, dass der Einfluss beider Antibiotika sehr ähnlich ist. Sowohl die mit Tobramycin, als auch die mit Ciprofloxacin inkubierten *P. aeruginosa* Zellen starben innerhalb der beobachteten Zeitspanne von 7 h bis auf eine Anzahl von ca.  $1 \times 10^2$  KBE/ml ab. Außerdem ist deutlich zu erkennen, dass sich alle drei getesteten Transposonmutanten etwa so verhielten wie *P. aeruginosa* PAO1. Betrachtet man vergleichend die Absterbekurven planktonischer Kulturen, die in AUM kultiviert worden sind (Abbildung 8B und 8D), so fällt auf, dass insgesamt mehr Zellen die Zugabe der 5-fachen MIC beider Antibiotika überlebten als es in 1:10 LB der Fall war (Abbildung 8A und 8C).

Mit etwa  $1 \times 10^3$  KBE/ml überlebten ca. 10-fach mehr Zellen die Antibiotikabehandlung in AUM als in 1:10 LB. Hier bestätigte sich das Ergebnis der

MIC-Bestimmungen (Kapitel 3.5.2) noch einmal deutlich. Die Harnwegs-ähnlichen Bedingungen in AUM erhöhen die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* messbar. Bei den verbleibenden  $1 \times 10^2$  KBE/ml könnte es sich, wie in Kapitel 3.3 beschrieben um Persisterzellen handeln, die als Subpopulation in einer Art Ruhezustand in der Bakterienkultur verbleiben und aufgrund ihres nahezu inaktiven Metabolismus eine besonders hohe Antibiotikatoleranz aufweisen (Lewis, 2007).

Während sich die Transposonmutanten PAO1 $\Delta$ algR und PAO1 $\Delta$ spuE auch in AUM dem PAO1 Wildtyp sehr ähnlich verhielten, überlebten die Zellen der PAO1 $\Delta$ fumC1-Mutante die Antibiotikabehandlung wesentlich besser. Dieser Effekt war unter Einfluss beider Antibiotika deutlich zu erkennen. Die Zellen der PAO1 $\Delta$ fumC1-Mutante überlebten den Einfluss beider Antibiotika mit ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ml (Abbildung 8B und 8D) ca. 100 x besser während der Ciprofloxacin-Behandlung und ca. 1.000 x besser unter Einfluss von Tobramycin als der Wildtyp PAO1.

Die PAO1 $\Delta$ fumC1-Mutante scheint einen Vorteil gegenüber dem Wildtyp zu haben, der ihr in AUM eine erhöhte Antibiotikatoleranz ermöglicht. Die Menge der überlebenden Zellen geht mit ~ 0,1 % in diesem Fall deutlich über den Anteil von Persisterzellen in einer Bakterienkultur hinaus, der in *P. aeruginosa* Kulturen während der exponentiellen Wachstumsphase für gewöhnlich bei 0,04 % liegt (Möker *et al.*, 2010). Für *E. coli* ist allerdings ein maximaler Persisterzell-Anteil von ca. 1 % der Population beschrieben worden (Lewis, 2007). Dieser Antibiotikatolerante Phänotyp der PAO1 $\Delta$ fumC1 Transposonmutante war ausschließlich in AUM zu beobachten. Trotz unterschiedlicher Wirkungsweisen hatten das Aminoglykosid-Antibiotikum und das Fluorchinolon denselben Effekt auf die PAO1 $\Delta$ fumC1-Mutante, was darauf schließen lässt, dass der beobachteten Antibiotikaresistenz ein allgemeinerer Mechanismus zugrunde liegt

#### **3.5.4.2. Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa*-Biofilmen**

Während des Wachstums im Biofilm gelten die Zellen von *P. aeruginosa* als besonders Antibiotika-tolerant (Hill *et al.*, 2005). Diese Aussage von Hill *et al.* ließ sich anhand der Ergebnisse von Absterbeexperimenten (Kapitel 3.3) bereits eindeutig bestätigen. Auch von den *P. aeruginosa* PAO1 Transposonmutanten sollte nun das Absterbeverhalten während des Biofilmwachstums betrachtet werden. Die Ergebnisse



sind in Tabelle 15 dargestellt. Während die *P. aeruginosa* Transposonmutanten Biofilme nach der Behandlung mit der 10-fachen MIC Tobramycin oder Ciprofloxacin in beiden Medien eine Überlebensrate von ca.  $5 \times 10^3$  KBE/ml aufwiesen (Tabelle 15), überlebten je nach Medium nur  $1 \times 10^2$  KBE/ml (1:10 LB-Medium) bzw.  $1 \times 10^3$  KBE/ml (AUM) der planktonisch lebenden *P. aeruginosa* Zellen die Behandlung mit der 5-fachen MIC beider Antibiotika (Abbildung 8). Diese Beobachtungen bestätigen noch einmal die während der MIC-Bestimmungen gewonnenen Erkenntnisse der stark erhöhten Antibiotikatoleranz von Biofilmen im Vergleich zu planktonisch lebenden Zellen (Kapitel 3.5.3).

**Tabelle 15:** Absterberaten und die minimal erreichte Anzahl der KBE/ml von 24 h inkubierten Biofilmen von *P. aeruginosa* PAO1 und den Transposonmutanten PAO1 $\Delta$ *fumC1*, PAO1 $\Delta$ *algR* und PAO1 $\Delta$ *spuE* in AUM und 1:10 LB, aerob bei 37 °C und 200 rpm mit der 10-fachen MIC der Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei von einander unabhängigen Messungen.

<i>P. aeruginosa</i> -Stamm	Absterberate $\mu$	min. KBE/ml
1:10 LB Tobramycin		
PAO1	-0,6	$7,5 \times 10^2$
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	-0,6	$6,7 \times 10^2$
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	-0,5	$2,5 \times 10^4$
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	-0,5	$1,7 \times 10^4$
1:10 LB Ciprofloxacin		
PAO1	-0,6	$2,8 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	-0,6	$1,3 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	-0,6	$9,0 \times 10^2$
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	-0,5	$5,7 \times 10^3$
AUM Tobramycin		
PAO1	-0,5	$6,8 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	-0,5	$1,8 \times 10^4$
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	-0,5	$8,1 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	-0,5	$9,3 \times 10^3$
AUM Ciprofloxacin		
PAO1	-0,6	$2,2 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	-0,5	$8,2 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>algR</i>	-0,5	$4,5 \times 10^3$
PAO1 $\Delta$ <i>spuE</i>	-0,5	$3,5 \times 10^3$

Die während der Experimente mit Flüssigkulturen beobachteten Medieneinflüsse auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* (Kapitel 3.3) waren während des Biofilmwachstums wie auch schon für den Wildtyp (Kapitel 3.3) bei den Transposonmutanten nicht zu beobachten. Das hier gezeigte Absterbeverhalten unter Ciprofloxacin- und Tobramycin-Einfluss wies nicht auf eine erhöhte Antibiotikatoleranz der Biofilmzellen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen hin. Sowohl die Absterberate, als auch die minimal erreichten Zellzahlen in KBE/ml sind in 1:10 LB und AUM vergleichbar. Dies war auch schon während der MIC-Bestimmungen (Kapitel 3.2.2) und der Absterbeversuche des PAO1 Wildtyps (Kapitel 3.3) zu beobachten und wurde dort ausführlich diskutiert.

Das stark erhöhte Überleben der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Mutante, verglichen mit dem *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp in AUM, das im Kapitel 3.5.4.1 während des Absterbens planktonischer Kulturen zu beobachten war, ist auf Agarnährmedium nicht so deutlich. Wie in Tabelle 15 zu sehen ist, gleichen sich sowohl die Absterberate, als auch die Anzahl der minimal erreichten KBE/ml der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante und des PAO1 Wildtyps. Die Transposonmutante PAO1 $\Delta$ *fumC1* zeigte während der Absterbeversuche im Filterbiofilm kaum erhöhte Antibiotikatoleranz. Dies lässt auf einen Stoffwechseleffekt schließen, der hauptsächlich in planktonischen Kulturen auftritt und während des Biofilmwachstums wenig Einfluss hat. Desweiteren konnte in planktonischen Kulturen eine Wachstumsphasenabhängigkeit der Resistenz gezeigt werden. Dieses Absterbeverhalten steht im Einklang mit der Erkenntnis aus Kapitel 3.3, dass der Einfluss des Nährmediums auf die Antibiotikatoleranz planktonischer Kulturen deutlich stärker ist als auf Biofilme, die in ihrer Zellphysiologie mit Stationärphasekulturen vergleichbar sind. Die erhöhte Resistenz der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante hatte sich in planktonischer Kultur als medienabhängig erwiesen (Kapitel 3.5.4.1).

Nach dieser ausführlichen Untersuchung des Absterbeverhaltens und der Antibiotikaempfindlichkeit der ausgewählten PAO1 Transposonmutanten, sollten diese einzeln näher betrachtet werden. Verschiedene Experimente, bei denen die Transposonmutanten immer jeweils im Vergleich zum Wildtyp getestet worden sind, sollten Aufschluss auf die Rolle der entsprechenden Proteine in der Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* geben.

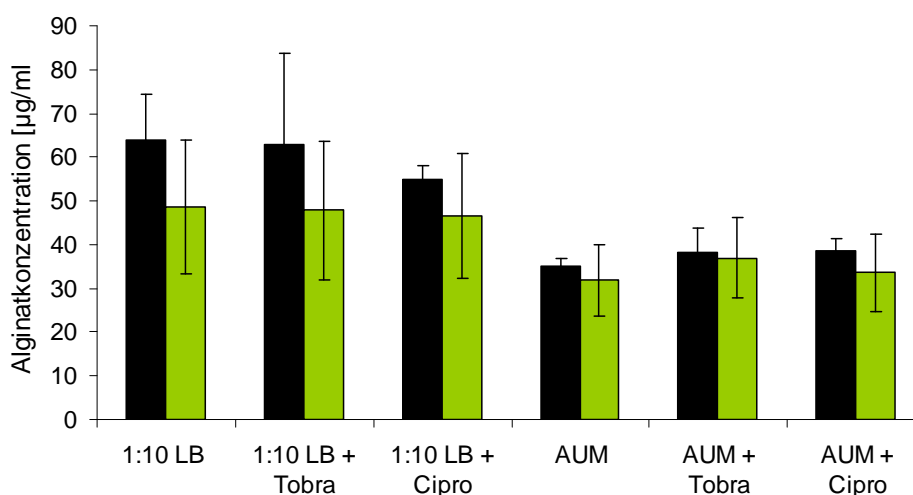
### **3.5.5. Der Transkriptionsregulator AlgR und sein Einfluss auf Antibiotikaresistenz in *P. aeruginosa***

Während Proteomanalysen (Kapitel 3.5) war die Produktion des AlgR Proteins in Biofilmen, die auf 1:10 verdünntem LB-Medium inkubiert worden waren erhöht. Biofilmzellen, die auf AUM gewachsen waren enthielten eine geringere AlgR Proteinmenge. Daher sollte ein eventueller Einfluss von AlgR auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* näher untersucht werden.

Der Transkriptionsregulator AlgR, der ein Regulator der LytTR-Familie ist, kontrolliert verschiedene Prozesse in der Zelle (Deretic *et al.*, 1989; Nikolskaya und Galperin, 2002). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass AlgR sowohl für die Regulation der Beweglichkeitsform „Twitching motility“ (Whitchurch *et al.*, 1996), als auch für die Virulenz von *P. aeruginosa* essentiell ist (Lizewski *et al.*, 2004). Laut Transkriptomanalysen mit Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> mit *P. aeruginosa* PAO1 und einer *algR*-Deletionsmutante, aktiviert AlgR in der logarithmischen Wachstumsphase die Expression von 58 Genen und reprimiert die Expression von 37 anderen (Lizewski *et al.*, 2004). Eine, evtl. für die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* bedeutsame, Funktion von AlgR ist die Regulation der Alginatbiosynthese. Das negativ geladene Exopolysaccharid Alginat umgibt nach seiner Sekretion die *P. aeruginosa* Zellen wie ein schützender Schleim und behindert so das Eindringen verschiedener Antibiotikaklassen in die Zelle (Mah und O'Toole, 2001). Beispielsweise binden die meist positiv geladenen Aminoglykoside an das negativ geladene extrazelluläre Polysaccharid (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988) und werden durch diese Bindung daran gehindert in die *P. aeruginosa* Zelle einzudringen. Eine erhöhte Alginatproduktion unter Antibiotikaeinfluss könnte daher die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* erhöhen. AlgR reguliert die Alginatbiosynthese, indem es an drei Stellen im *algD*-Promotor bindet und so die Transkription aktiviert (Mohr *et al.*, 1991, Mohr *et al.*, 1992). Außerdem reguliert AlgR die Alginatproduktion über *algC*, indem es an dessen Promotor bindet und seine Expression aktiviert (Zielinski *et al.*, 1991; Zielinski *et al.*, 1992). Das Gen *algC* liegt außerhalb des Alginatbiosynthese-Operons und kodiert für eine Phosphomannomutase, die einen der ersten Schritte der Alginatbiosynthese katalysiert (Remminghorst und Rehm, 2006). Eine Mutation in *algR* im mucoiden *P.*

*aeruginosa* Stamm FRD1 resultiert in einem Verlust der Alginatproduktion und einem Rückgang der *algD* Transkription (Wozniak und Ohman, 1994).

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurden mit einer *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *algR*-Transposonmutante neben den beschriebenen MIC-Bestimmungen (Kapitel 3.5.2 und 3.5.3) und Absterbeversuchen (Kapitel 3.5.4) eine Quantifizierung der unter Antibiotikaeinfluss gebildeten Alginatmengen durchgeführt. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben 24 h alte Filterbiofilme von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ *algR* mit 3  $\mu$ g/ml Tobramycin oder 0,6  $\mu$ g/ml Ciprofloxacin 4 h lang inkubiert und deren Alginatkonzentration pro Filterbiofilm mit der von unbehandelten Filterbiofilmen verglichen (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Alginat-Konzentration in *P. aeruginosa* Filterbiofilmen. Nach 24 h Inkubation auf 1:10 LB- oder AUM-Agar bei 37 °C, wurden die Filterbiofilme für 4 h auf Antibiotika-haltigem Nähr-Agar mit der 1-fachen MIC Tobramycin (3  $\mu$ g/ml) oder Ciprofloxacin (0,6  $\mu$ g/ml) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei von einander unabhängigen Experimenten, die in Dreifachbestimmung durchgeführt worden sind. schwarz: PAO1, grün: PAO1 $\Delta$ *algR*.

Wie Abbildung 9 zeigt, enthielten *P. aeruginosa* Biofilme auf 1:10 LB-Medium ca. 20 % mehr Alginat, als unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen (auf AUM-Agar). Diese Ergebnisse bestätigen die in den Proteomanalysen erhöht gefundene AlgR-Protein Menge, die in Kapitel 3.5 beschrieben wurde. Außerdem bestätigen diese Ergebnisse in Kombination mit den oben erläuterten Aussagen der Literatur, dass AlgR die Alginatbiosynthese positiv reguliert. Die gebildete Alginatmenge korreliert allerdings nicht mit der Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa*, die auf AUM erhöht gefunden

wurde (Kapitel 3.5.3). Auch hatte die Inkubation der Filterbiofilme auf Antibiotika-haltigem Nähragar keinen messbaren Einfluss auf die gebildete Alginatmenge. Desweiteren produziert die PAO1 $\Delta$ algR-Mutante zwar weniger Alginat als der PAO1 Wildtyp, ihre Antibiotikatoleranz ist aber, wie die MIC-Bestimmungen (Kapitel 3.5.3) und Absterbeversuche (Kapitel 3.5.4) zeigten, davon nicht beeinträchtigt.

Da beschrieben ist, dass Alginat die Diffusion von Antibiotika durch einen Biofilm hindurch beeinflussen kann (Mah und O'Toole, 2001a; Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1988), sollte hier überprüft werden, inwieweit dies innerhalb unseres Testsystems eine Rolle spielt. Wie in Kapitel 2.5.12 beschrieben wurden 24 h alte Filterbiofilme von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ algR 16 h lang auf Antibiotika-haltigem Nähragar inkubiert. Die während dieser Zeitdauer auf den Biofilmen platzierten Antibiotikatestplättchen (AB-Testblättchen) nahmen durch den Biofilm hindurch diffundierte Antibiotika-Mengen auf. Während der anschließenden Inkubation auf einem konfluenten Bewuchs durch *E. coli* DH10B verursachten diese Hemmhöfe unterschiedlicher Größe. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 16 dargestellt.

Wie Tabelle 16 zeigt, diffundierten sowohl Tobramycin, als auch Ciprofloxacin innerhalb von 16 h beinahe ungehindert durch den *P. aeruginosa* Biofilm hindurch. Die Hemmhöfe der auf den Biofilmen platzierten AB-Testblättchen, waren ähnlich groß wie die der AB-Testblättchen, die direkt auf dem Antibiotika-haltigen Nähragar gelegen hatten. Hierbei verursachte Ciprofloxacin stets größere Hemmhöfe innerhalb des konfluenten *E. coli* Bewuchses, als Tobramycin, was darauf hinweist, dass der verwendete *E. coli*-Stamm DH10B (wie auch *P. aeruginosa*) sensibler auf Ciprofloxacin reagiert. Auch das gewählte Nährmedium (1:10 LB-Medium /AUM) hatte unter diesen Umständen keinen Einfluss auf die Diffusion der Antibiotika durch die *P. aeruginosa* Biofilme, obwohl *P. aeruginosa* auf 1:10 LB-Medium messbar mehr Alginat bildete als auf AUM (s. o.). Der Vergleich zwischen *P. aeruginosa* PAO1 und der PAO1 $\Delta$ algR-Transposonmutante zeigte keine messbaren Unterschiede. Obwohl PAO1 $\Delta$ algR auf 1:10 LB-Agar ca. 20 % weniger Alginat bildet als der PAO1 Wildtyp (s. o.), verbesserte sich die Diffusion von Tobramycin und Ciprofloxacin durch diese Biofilme nicht.

**Tabelle 16:** Diffusions der Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin durch *P. aeruginosa* Biofilme. In jeweils drei von einander unabhängigen Experimenten wurde die Diffusion beider Antibiotika durch *P. aeruginosa* PAO1- und PAO1Δ*algR*-Biofilme hindurch mit Hilfe von AB-Testblättchen untersucht. Die Radien der in einem *E. coli* DH10B Rasen erzeugten Hemmhöfe sind in dieser Tabelle nebst Standardabweichungen dargestellt.

<i>P. aeruginosa</i> PAO1				
1:10 LB				
	Tobramycin		Ciprofloxacin	
	Biofilm	Agar	Biofilm	Agar
aerob	3,5 ± 1,3	3,0 ± 0,0	11,2 ± 3,1	11,0 ± 2,6
anaerob	1,8 ± 0,3	2,2 ± 0,3	8,0 ± 0,7	7,3 ± 0,6
AUM				
	Tobramycin		Ciprofloxacin	
	Biofilm	Agar	Biofilm	Agar
aerob	1,0 ± 1,2	2,2 ± 1,0	11,3 ± 2,1	10,7 ± 3,1
anaerob	0,9 ± 0,7	2,0 ± 0,0	7,5 ± 0,5	8,3 ± 0,6
<i>P. aeruginosa</i> PAO1Δ <i>algR</i>				
1:10 LB				
	Tobramycin		Ciprofloxacin	
	Biofilm	Agar	Biofilm	Agar
aerob	4,0 ± 1,5	3,3 ± 1,5	8,5 ± 1,7	8,5 ± 0,7
anaerob	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,3	8,0 ± 0,0	9,0 ± 1,0
AUM				
	Tobramycin		Ciprofloxacin	
	Biofilm	Agar	Biofilm	Agar
aerob	2,6 ± 0,8	3,3 ± 1,2	11,2 ± 2,7	11,0 ± 2,0
anaerob	1,2 ± 1,0	2,2 ± 0,3	7,4 ± 1,3	8,7 ± 0,6

Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich keine nennenswerte Beeinflussung der Diffusion von Tobramycin oder Ciprofloxacin durch die Transposonmutation in *algR* feststellen. Auch die Unterschiede in der gebildeten Alginatmenge zwischen Biofilmen, die auf 1:10 LB oder AUM gewachsen waren (Abbildung 9) beeinflusste die Diffusion der getesteten Antibiotika nicht messbar (Tabelle 16). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Produktion von Alginat allein keinen Mechanismus von *P. aeruginosa* darstellt, der dessen Antibiotikaresistenz unter den hier getesteten Bedingungen erhöht. Es sind offenbar noch andere Mechanismen an der unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen erhöhten Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* beteiligt.

### 3.5.6. Das Protein SpuE und seine Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa*

SpuE wurde während der in Kapitel 3.5 erwähnten Proteomanalysen Medien-unabhängig unter Tobramycineinfluss erhöht beobachtet. Das SpuE-Protein ist in *P. aeruginosa* Teil eines ABC-Transporters, der für die Aufnahme von Spermidin in die Zelle verantwortlich ist. Das Spu- (spermidine and putrescine utalization) Operon, welches aus den neun Genen *spuABCDEFGH-spuI* besteht, wird von dem Promotor  $P_{\text{spuA}}$  reguliert, der von den Polyaminen Putrescin und Spermidin aktiviert werden kann (Lu *et al.*, 2002). Die Gene *spuDEFGH* kodieren für einen ABC-Transporterkomplex zur Spermidinaufnahme, wobei *spuD* und *spuE* als periplasmatische Bindeproteine innerhalb dieses Transporters fungieren (Lu *et al.*, 2002). In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Spermidine und andere Polyamine, dem Medium hinzugefügt, die Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen erhöhen (Kwon und Lu, 2006). Beispielsweise ist bekannt, dass Putrescin in *E. coli* oxidativen Stress verringert und zu erhöhter Resistenz gegen Wasserstoffperoxid führt (Tkachenko *et al.*, 2001), indem es als Radikalfänger fungiert (Ye *et al.*, 1997).

Mit Hilfe einer *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *spuE*-Transposonmutante sollte in dieser Arbeit die Bedeutung des SpuE-Proteins im Zusammenhang mit der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* näher betrachtet werden. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, Filterbiofilme sowohl auf 1:10 LB-Medium, als auch auf AUM 24 h inkubiert, bevor sie für 4 h mit sublethalen Antibiotikakonzentrationen behandelt wurden. Anschließend wurden Proben wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben für die Metabolomanalyse präpariert und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schomburg, Technische Universität Braunschweig, Institut für Bioinformatik und Biochemie mittels GC-MS analysiert. Die Zugabe von Tobramycin oder Ciprofloxacin ergab nach statistischer Auswertung der Daten auf beiden Medien keine signifikant veränderten Metabolite, weder im Wildtyp, noch in der PAO1 $\Delta$ *spuE*-Transposonmutante. *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ *spuE* unterschieden sich in der Produktion von 24 Metaboliten signifikant, von denen 10 nicht identifiziert werden konnten. Bei den übrigen handelte es sich unter anderem um verschiedene Aminosäuren und Zucker. Unterschiede die Spermidin-Konzentration betreffend konnten hierbei allerdings nicht festgestellt werden. Möglicherweise gleicht das periplasmatische Bindeprotein SpuD

das Fehlen von SpuE in der PAO1 $\Delta$ *spuE*-Transposonmutante aus. Da sich außerdem das zuvor aufgezeichnete Absterbeverhalten von PAO1 $\Delta$ *spuE* nicht bzw. kaum von dem des PAO1 Wildtyps unterschied (Kapitel 3.5.4), scheint SpuE alleine, unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* zu haben. Scheinbar existiert in diesem Zusammenhang noch ein weiterer Mechanismus der die Antibiotikatoleranz beeinflusst. Möglicherweise waren jedoch auch die Testbedingungen nicht optimal. Es wäre denkbar, dass Variationen der Antibiotikakonzentration oder Inkubationszeit andere Ergebnisse geliefert hätten.

### **3.5.7. Die Fumarase FumC1 und ihr Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa***

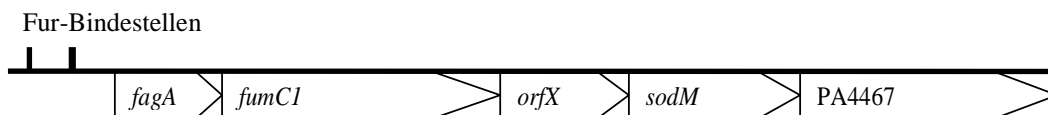
Das Protein FumC1 wurde während Proteomanalysen (Kapitel 3.5) in *P. aeruginosa* Biofilmen erhöht vorgefunden, die unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen gewachsen waren.

*P. aeruginosa* besitzt drei unterschiedliche Fumarathydratasen, die von den Genen *fumA*, *fumB* und *fumC* kodiert werden. Während die dimeren Enzyme FumA und FumB Eisen-Schwefel-Zentren besitzen und somit sauerstoffempfindlich sind, ist die Fumarase FumC tetramerisch aufgebaut und unter Sauerstoffeinfluss stabil (Cronan und LaProte, 2006). FumC besitzt kein Eisen-Schwefel-Zentrum und funktioniert als Ersatzenzym für FumA unter Eisenmangelbedingungen und oxidativem Stress (Cronan und LaProte, 2006). Als Teil des Zitratzyklus katalysiert die Fumarathydratase die Reaktion von Fumarat zu Malat.

Das *fumC1*-Gen liegt auf einem Operon mit der Superoxiddismutase *sodM* und den Genen *fagA*, *orfX* und PA4467 (Abbildung 10). Vor der Promotorregion des Operons befinden sich zwei Bindestellen für den Transkriptionsregulator Fur, der als Repressor die Promotorregion und damit die Transkription des Operons blockiert, wenn er bindet. Da Fur ein eisenabhängiger Transkriptionsregulator ist, wird die Transkription des gesamten Operons während der Anwesenheit von Eisen reprimiert und nur unter Eisenmangelbedingungen ermöglicht. Außerdem ist dieses Operon Teil des SoxS-Modulons, welches *P. aeruginosa* dem Schutz vor oxidativem Stress dient (Tseng et al., 2001), da es die Superoxiddismutase *sodM* enthält. Die Gene *fagA*, *orfX* und PA4467 kodieren für hypothetische Proteine, ihre Funktion ist bisher unbekannt. PA4467 besitzt



jedoch große Ähnlichkeiten zu aus *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas fluorescens* bekannten Zink- und Eisen-Transport-Proteinen.



**Abbildung 10:** Das Operon, in dem das *fumC1*-Gen lokalisiert ist, enthält außerdem die Gene *fagA*, *orfX*, *sodM* und PA4467. Vor der Promotorregion befinden sich zwei Bindestellen für den Transkriptionsregulator Fur, der unter Eisenanwesenheit bindet und den Promotor blockiert.

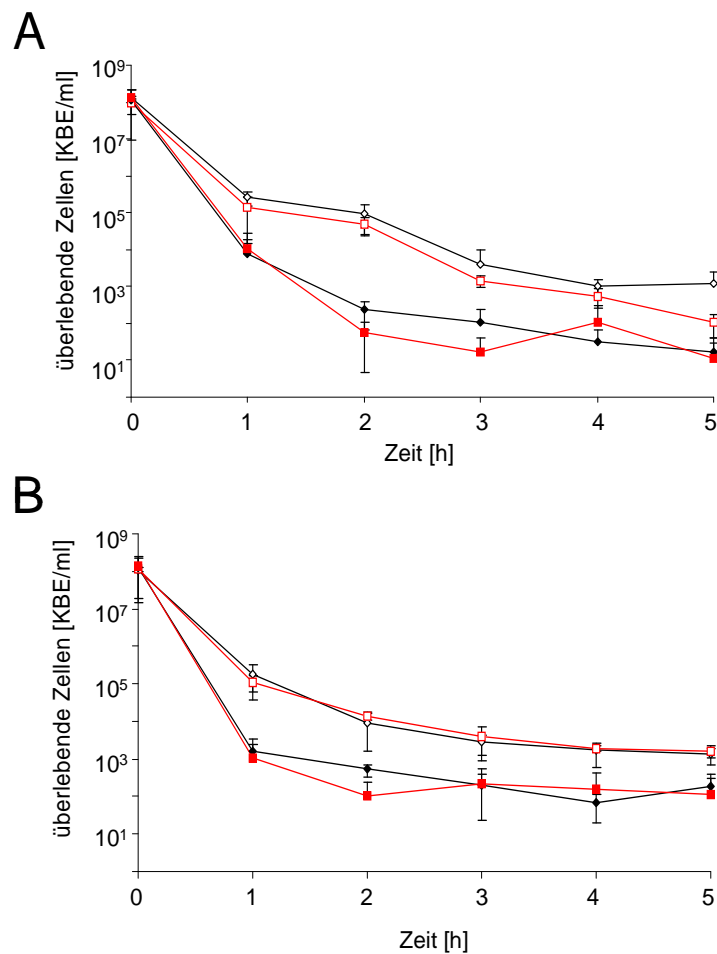
### 3.5.7.1. Der Einfluss der Eisenverfügbarkeit auf die Antibiotikateranz von *P. aeruginosa*

Für die nähere Untersuchung des Einflusses von Eisen auf die Antibiotikateranz von *P. aeruginosa* gab es mehrere Gründe. Zum einen ist bereits bekannt, dass die Eisenkonzentration des Nährmediums einen Effekt auf die Antibiotikateranz von *P. aeruginosa* haben kann (Yeom *et al.*, 2010), zum anderen wird die Expression des Operons, in dem das *fumC1*-Gen liegt, wie in Abschnitt 3.5.7 beschrieben, unter Anwesenheit von Eisen durch den Fur-Regulator reprimiert. Während einer Harnwegsinfektion und auch im hier verwendeten artifiziellen Urin findet *P. aeruginosa* nur sehr geringe Mengen Eisen (<0,005 mM) vor. Die erhöhte Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen könnte daher mit den beschriebenen Eisenmangelbedingungen zusammen hängen.

Desweiteren konnten Yeom *et al.* zeigen, dass im Medium enthaltenes Eisen über die Fenton-Reaktion die Menge der unter Antibiotikaeinfluss gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies erhöht. Somit steigt die Antibiotikaempfindlichkeit von *P. aeruginosa* mit zunehmender Eisenverfügbarkeit (Yeom *et al.*, 2010).

Ob die Variation des Eisengehaltes im Nährmedium einen Einfluss auf das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* PAO1 und der PAO1Δ*fumC1*-Transposonmutante zeigt, sollte in zwei unterschiedlichen Experimenten überprüft werden. Zunächst wurden Absterbeversuche in 1:10 LB-Medium durchgeführt, dem mit Hilfe eines Chelators Kationen inklusive Eisen entzogen wurde und anschließend alle anderen

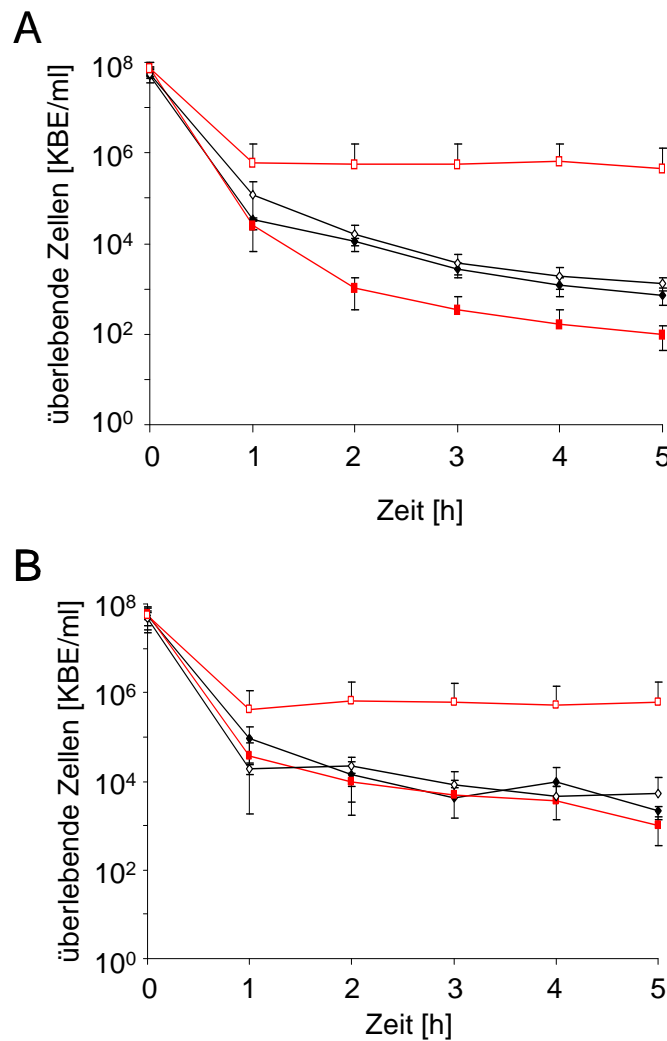
essentiellen Ionen wieder zugesetzt wurden (Kapitel 2.3.2). In diesem eisenfreien 1:10 LB-Medium wurde das Absterben von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ *fumC1* genauso dokumentiert wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.5.8). Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Abbildung der Negativkontrolle, in der das Wachstum beider *P. aeruginosa* Stämme ohne Antibiotikazugabe überprüft wurde, ist hier nicht dargestellt. Die Wachstumsraten von *P. aeruginosa* waren durch den Entzug von Eisen unbeeinflusst, die Lebendzellzahlen und OD<sub>578 nm</sub> der Kulturen waren mit den im herkömmlichen 1:10 LB-Medium gewachsenen Kulturen vergleichbar.



**Abbildung 11:** Antibiotikatoleranz planktonischer Kulturen in 1:10 LB (gefüllte Symbole) und Eisen-freiem 1:10 LB (offene Symbole), die während der logarithmischen Wachstumsphase (1,5 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (A) und Ciprofloxacin (B) behandelt worden sind. schwarz: PAO1, rot: PAO1 $\Delta$ *fumC1*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei von einander unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, überlebte *P. aeruginosa* die durchgeführte Antibiotika-Behandlung in Eisen-freiem 1:10 LB-Medium besser. Die eintretenden Eisenmangelbedingungen verbessern das Überleben beider getesteter Stämme um ca. eine Log-Stufe. Die Daten, die während der Behandlung mit Tobramycin (Abbildung 11A) gesammelt wurden, sind mit denen vergleichbar, die unter Ciprofloxacin-Einfluss (Abbildung 11B) aufgenommen wurden. Auf beide Antibiotika reagierte *P. aeruginosa* unter Eisenmangelbedingungen gleichsam weniger empfindlich. Die Transposonmutante PAO1 $\Delta$ *fumC1* verhielt sich unter Eisenmangelbedingungen genau wie der PAO1 Wildtyp, obwohl die Expression des *fumC1/sodM*-Operons unter Eisenmangelbedingungen stattfinden sollte. Offensichtlich haben, neben dem Eisenmangel, dem *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen (im AUM) ausgesetzt ist, noch andere Inhaltsstoffe des AUMs Einfluss auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa*. Daher sollte untersucht werden, wie sich die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* verändert, wenn dem AUM, Eisen zugegeben wird. Hierfür wurde AUM, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, hergestellt und mit zusätzlichen 7 mg/ml FeSO<sub>4</sub> (46 mM) versetzt. Hierbei handelte es sich um eine Konzentration, die standardmäßig bereits für Experimente mit *P. aeruginosa* verwendet wurde (Heydorn *et al.*, 2000). Wie beschrieben wurden in diesem Medium Absterbeversuche durchgeführt und die Ergebnisse der KBE-Bestimmungen in Abbildung 12 dargestellt.

Wie Abbildung 12 zeigt, beeinflusste die Eisenzugabe die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* PAO1 unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen nicht. Die Wirkung der 5-fachen MIC beider Antibiotika auf den Wildtyp blieb unverändert. Die PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante hingegen verlor durch die Eisenzugabe ihre erhöhte Antibiotikaresistenz in AUM. Sie zeigte sich in diesem Experiment genauso empfindlich gegenüber Ciprofloxacin (Abbildung 12B) wie der PAO1 Wildtyp. Gegenüber Tobramycin zeigte sich die PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante allerdings sogar noch empfindlicher durch die Zugabe von Eisen, als der Wildtyp. Es überlebten ca. 1 Log-Stufe weniger Zellen [KBE/ml] der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Mutante, als des PAO1 Wildtyps diese Behandlung.



**Abbildung 12:** Antibiotikatoleranz planktonischer Kulturen in AUM (offene Symbole) und AUM mit zusätzlichen  $7 \text{ mg/ml FeSO}_4$  (gefüllte Symbole), die während der logarithmischen Wachstumsphase (1,5 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (A) oder Ciprofloxacin (B) behandelt worden sind. schwarz: PAO1, rot: PAO1 $\Delta fumC1$ . Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei von einander unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Ergebnisse sagen, dass die Verfügbarkeit von Eisen im Nährmedium Einfluss auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* hat. Die Ergebnisse von Yeom *et al.*, 2010 konnten somit bestätigt werden. Die erhöhte Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen allerdings ließ sich nicht mit einer einfachen Eisenzugabe zum AUM eliminieren. Es müssen daher noch andere Harnwegs-spezifische Faktoren diesbezüglich eine Rolle spielen, sodass der im AUM und im Urin herrschende Eisenmangel nicht der einzige Faktor ist, der die Antibiotikaempfindlichkeit von *P. aeruginosa* verringert. Auf die erhöhte Antibiotikatoleranz der PAO1 $\Delta fumC1$ -Transposonmutante hatte die

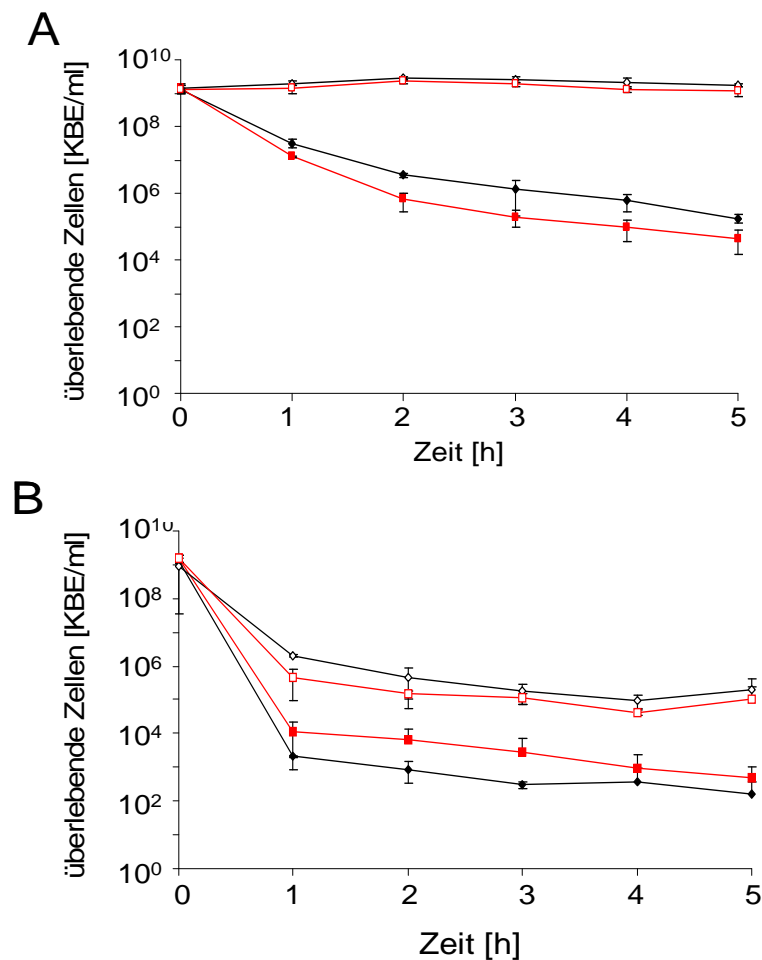
Eisenzugabe allerdings den erwarteten Effekt. Ihre Ciprofloxacin-Empfindlichkeit konnte wiederhergestellt, und ihre Tobramycin-Empfindlichkeit sogar noch verstärkt werden. Diese Experimente lieferten also deutliche Hinweise darauf, dass das beschriebene *fumC1/sodM*-Operon tatsächlich in den unter Kapitel 3.5.4.1 beobachteten Antibiotikaresistenz-Mechanismus involviert ist.

#### **3.5.7.2. Der Einfluss der Wachstumsphase auf die erhöhte Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *fumC1***

Da bereits ein starker Einfluss der Wachstumsphase auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* gezeigt werden konnte (Kapitel 3.3), sollte nun getestet werden, ob auch die erhöhte Antibiotikaresistenz der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante von der Wachstumsphase abhängig ist. Daher wurden die *P. aeruginosa* Stämme PAO1 und PAO1 $\Delta$ *fumC1* bis in die frühe Stationärphase hinein (4 h) inkubiert und anschließend mit Tobramycin und Ciprofloxacin behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Wie zuvor wurde das Absterbeverhalten der beiden Stämme sowohl in 1:10 LB-Medium, als auch in AUM beobachtet (Abbildung 13). Betrachten man die in 1:10 LB aufgenommenen Absterbekurven, so fällt auf, dass sich die Wirkung der beiden Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin deutlich voneinander unterscheidet. Wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.3) beeinflussen sowohl Wachstumsphase der Kultur, als auch die Nährstoffzusammensetzung des Mediums die Wirksamkeit der Antibiotika beträchtlich.

Desweiteren ist in Abbildung 13 zu erkennen, dass sich die PAO1 $\Delta$ *fumC*-Transposonmutante unter diesen Bedingungen dem *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp sehr ähnlich verhält. Die während der Versuche mit Kulturen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase beobachteten Unterschiede in der Antibiotikatoleranz zwischen Wildtyp und Transposonmutante sind hier nicht zu erkennen. Der antibiotikatolerantere Phänotyp der Mutante ist in Stationärphasekulturen, wie auch zuvor im Biofilm, nicht zu beobachten und scheint deutlich von der Wachstumsphase abhängig zu sein.

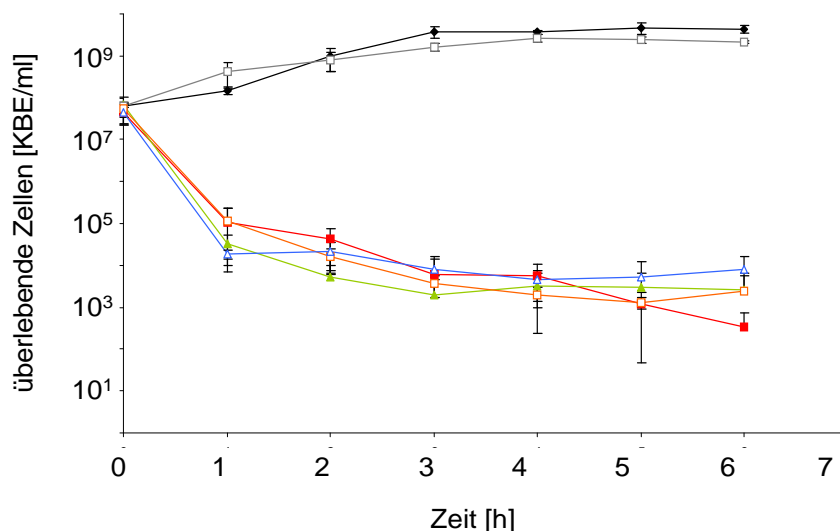


**Abbildung 13:** Antibiotikatoleranz planktonischer Kulturen in 1:10 LB (gefüllte Symbole) und AUM (offene Symbole), die zu Beginn der Stationärphase (4 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (A) oder Ciprofloxacin (B) behandelt worden sind. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei von einander unabhängigen Experimenten. schwarz: PAO1, rot: PAO1ΔfumC1

### 3.5.8. Der Einfluss von Fumarat im Nährmedium auf die Antibiotikatoleranz der *P. aeruginosa* PAO1ΔfumC1-Transposonmutante

Die Fumarathydratase FumC1 katalysiert innerhalb des Zitratzyklus die Reaktion von Fumarat zu Malat. Hierbei wird ein Molekül H<sub>2</sub>O addiert (Metzler, 2001). Würde sich aufgrund der Funktionslosigkeit in PAO1ΔfumC1 eine Anhäufung des Substrates Fumarat ergeben, wäre es theoretisch möglich, dass dies Auswirkungen auf den Metabolismus der Mutante hätte. Während der folgenden Experimente sollte untersucht werden, ob eine Erhöhung der Fumaratkonzentration einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* zeigt.

Hierzu wurde *P. aeruginosa* PAO1, wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.5.8), in AUM kultiviert, das 10 mM Fumarat enthielt. Nach 1,5 h Inkubation wurde dem Medium die 5-fache MIC Tobramycin oder Ciprofloxacin zugesetzt und das Absterben der Kulturen wie zuvor (Kapitel 2.5.8) dokumentiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Antibiotikatoleranz planktonischer *P. aeruginosa* PAO1-Kulturen in AUM (gefüllte Symbole) und AUM + 10 mM Fumarat (offene Symbole), die nach 1,5 h Wachstum mit der 5-fachen MIC Tobramycin (rot und orange) oder Ciprofloxacin (blau und grün) behandelt worden sind. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei von einander unabhängigen Experimenten. schwarz: PAO1 in AUM, grau: PAO1 in AUM + Fumarat, rot: PAO1 in AUM mit Tobramycin, orange: PAO1 in AUM + Fumarat mit Tobramycin, grün: PAO1 in AUM mit Ciprofloxacin, blau: PAO1 in AUM + Fumarat mit Ciprofloxacin.

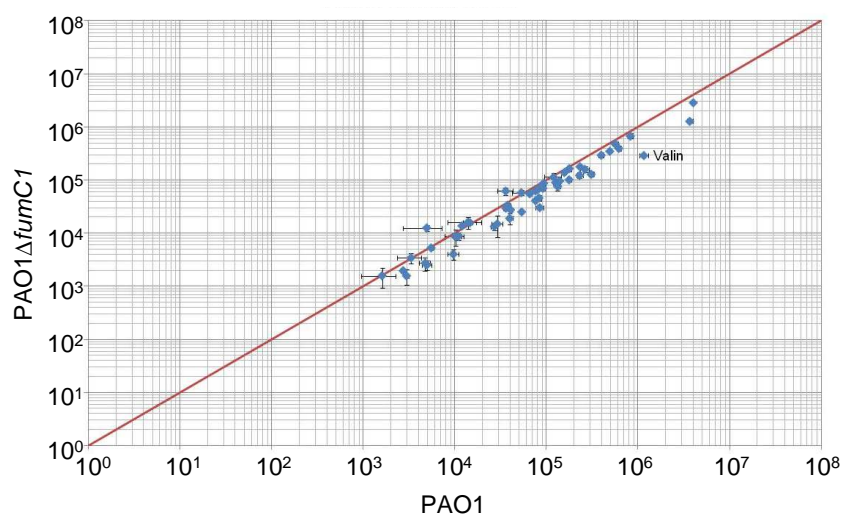
Wie hier deutlich zu sehen ist, hatten die zugesetzten 10 mM Fumarat unter den getesteten Bedingungen keinen messbaren Einfluss auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* PAO1. Weder das Wachstum der Negativkontrolle, noch das Absterbeverhalten der mit Tobramycin oder Ciprofloxacin inkubierten Kulturen wurde vom Fumarat messbar beeinflusst. Es sind daher wahrscheinlich andere Mechanismen für die erhöhte Antibiotikaresistenz der PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante verantwortlich. Die folgenden Metabolomanalysen sollten Aufschluss über die metabolischen Vorgänge in dieser Mutante geben.

### **3.5.9. Metabolomanalyse der antibiotikaresistenten *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante**

Die beobachtete Wachstumsphasenabhängigkeit des Phänotyps der PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante ist möglicherweise auf die unterschiedliche Stoffwechselaktivität von *P. aeruginosa* in den verschiedenen Wachstumsphasen zurückzuführen. Daher wurde im Folgenden der Stoffwechsel mittels Metabolomanalyse genauer betrachtet. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte einer Zelle zu erfassen und dadurch Rückschlüsse auf die Enzymaktivitäten und die Interaktionen zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen zu ziehen. Die zuvor beobachtete, erhöhte Antibiotikaresistenz von PAO1 $\Delta$ fumC1 wurde durch eine Mutation in einem Enzym des Zitratzyklus, hier die Fumarathydratase FumC1, verursacht. Daher sollten Veränderungen im Metabolom des Zentralstoffwechsels erkennbar sein. Außerdem sollte diese Analyse weitere Erkenntnisse über einen Zusammenhang mit dem zugrunde liegenden Antibiotika-Resistenzmechanismus liefern.

Die Kultivierung und Präparation der Proben erfolgte, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, ausschließlich in AUM. Die Kulturen von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ fumC1 wurden nach 1,5 h Inkubation mit der 1-fachen MIC Tobramycin (3  $\mu$ g/ml) oder Ciprofloxacin (0,3  $\mu$ g/ml) für weitere 2 h inkubiert. Die Vermessung der Metabolite wurde mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schomburg (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. In Abbildung 15 ist beispielhaft ein Scatterplot der Ergebnisse dargestellt, der den Vergleich zwischen *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp und der PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante zeigt.





**Abbildung 15:** Beispielhafte Abbildung eines Scatterplots der Metabolomanalyse. Dargestellt sind Metabolitkonzentrationen der Proben ohne Antibiotikabehandlung von *P. aeruginosa* PAO1 und der Transposonmutante PAO1ΔfumC1. Beide Stämme wurden für insgesamt 3,5 h in AUM bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Wie in Abbildung 15 deutlich zu sehen, gab es zwischen Wildtyp und Mutante kaum signifikante Unterschiede. Alle Metabolit-Spots lagen sehr nah an der Winkelhalbierenden und zeigten damit die große Ähnlichkeit der Metabolome der getesteten Stämme an. Auch die mit Antibiotikum behandelten Proben beider Stämme wiesen nur geringe Veränderungen in ihrem metabolischen Profil auf (Daten nicht gezeigt). Die mit Tobramycin behandelten Proben zeigten sowohl in PAO1, als auch in PAO1ΔfumC1 im Vergleich zu unbehandelten Proben eine allgemein verringerte Metabolitkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass durch die vom Tobramycin verursachte Zelllyse Metabolite verloren gingen, die bei der Präparation der Proben mit dem Überstand verworfen wurden. Die Wolke der Metabolit-Spots war daher zur Seite der Negativkontrolle verschoben, was die Auswertung differentiell produzierter Metabolite erschwerte. Dieser Effekt war in beiden Stämmen vergleichbar stark ausgeprägt und ließ keine Schlüsse auf ein verbessertes Überleben der PAO1ΔfumC1-Transposonmutante zu. Die Inkubation mit Ciprofloxacin zeigte ebenfalls weder im Wildtyp, noch in der Mutante weitreichende Veränderungen im metabolischen Profil, die auf veränderte Stoffwechselvorgänge in hindeuten würden.

Die in den getesteten *P. aeruginosa*-Stämmen und Bedingungen signifikant differentiell produzierten Metabolite sind in Tabelle 17 aufgelistet.

**Tabelle 17:** Differenziell produzierte Metabolite von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ *fumC1* in AUM unter Tobramycin- oder Ciprofloxacin-Einfluss. Dargestellt sind die Konzentrationsänderungen und P-Values der Metabolomanalysen jeweils drei von einander unabhängiger Experimente, die in Dreifachbestimmung durchgeführt worden sind. Es sind ausschließlich Metabolite mit einer >1,5-fachen Konzentrationsänderung aufgelistet.

Metabolit	Konzentrationsänderung	p-Value
Negativkontrolle vs. Tobramycin PAO1 Wildtyp		
Glutamat	2,0	$8,0 \times 10^{-11}$
Glukose-6-Phosphat	2,0	$1,3 \times 10^{-9}$
Lysin	1,6	$1,1 \times 10^{-7}$
Serin	1,8	$7,6 \times 10^{-10}$
4-Aminobutansäure	-1,9	$1,4 \times 10^{-8}$
Negativkontrolle vs. Tobramycin PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>		
$\beta$ -Alanin	2,2	$1,7 \times 10^{-6}$
Trehalose	2,0	$1,1 \times 10^{-6}$
Glutamat	2,0	$4,3 \times 10^{-8}$
Fruktose-6-Phosphat	1,8	$9,7 \times 10^{-6}$
Glukose-6-Phosphat	1,7	$2,9 \times 10^{-8}$
Valin	1,7	$8,2 \times 10^{-9}$
Serin	1,6	$2,5 \times 10^{-7}$
4-Aminobutansäure	-2,9	$1,0 \times 10^{-10}$
Negativkontrolle vs. Ciprofloxacin PAO1 Wildtyp		
Thymin	-1,8	$2,4 \times 10^{-5}$

Wie Tabelle 17 zeigt, waren die Konzentrationsänderungen mit Werten unter 2,9-fach insgesamt gering. Die meisten Unterschiede waren im Vergleich der Tobramycin-behandelten Proben beider Stämme mit den jeweiligen Negativkontrollen zu beobachten. Die hierbei innerhalb der unbehandelten Proben erhöht gefundenen Metabolite sind aufgrund der Zelllyse unter Tobramycin-Einfluss zurückhaltend zu bewerten. Bei einigen von ihnen handelt es sich um differenziell produzierte

proteinogene Aminosäuren, wie z. B. Glutamat, Lysin, Serin und Valin. 4-Aminobutansäure allerdings ist von beiden Stämmen unter Tobramycin-Einfluss 1,9- bis 2,9-fach erhöht produziert worden. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine Aminosäure, die allerdings nicht am Aufbau von Proteinen oder Peptiden beteiligt ist. Sie wird direkt aus Glutamat gebildet, welches in den unbehandelten Proben erhöht gefunden worden ist.

Die erwarteten Veränderungen innerhalb des Zentralstoffwechsels, dem Zitratzyklus und damit direkt verbundenen Stoffwechselwegen innerhalb der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante waren während dieser Messungen jedoch nicht zu beobachten. Auch ergaben diese Analysen keinen Hinweis auf den Resistenzmechanismus von *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *fumC1*. Das für die Metabolomanalysen gewählte Nährmedium wäre für die Beobachtung dieses Phänotyps geeignet gewesen, da sich die erhöhte Antibiotikaresistenz von PAO1 $\Delta$ *fumC1* zuvor (Kapitel 3.5.4.1) ausschließlich in AUM gezeigt hatte. Unter Umständen war die Konzentration der Antibiotika oder der Zeitpunkt der Messung (2 h nach Antibiotikazugabe) aber nicht optimal gewählt und eventuelle metabolische Anpassungen der Zellen waren schon zuvor abgeschlossen. Möglicherweise übernehmen die Fumarathydratasen FumA und FumB trotz des in AUM herrschenden Eisenmangels, die Funktion der funktionslosen Fumarase FumC1, sodass diese Mutation nicht zu einem in Metabolomanalysen messbaren Phänotyp führt. Desweiteren besitzt *P. aeruginosa* noch die Fumarathydratase FumC2, die ebenfalls die Aufgaben der FumC1 übernommen haben könnte. Der erhöhten Antibiotikaresistenz könnte daher ein anderer Resistenzmechanismus zugrunde liegen, den es mit den folgenden Analysen aufzuklären galt.

#### **3.5.10. Transkriptomanalyse der antibiotikaresistenten *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante**

Zur genaueren Untersuchung des antibiotikaresistenten Phänotyps der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante wurden, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, Transkriptomanalysen durchgeführt. *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ *fumC1* wurden genau wie für die Absterbeversuche in AUM bis in die logarithmische Wachstumsphase hinein inkubiert

(1,5 h) und anschließend für 1 h mit der 1-fachen MIC Tobramycin behandelt. Die darauf folgende Zellernte und Präparation der Proben für die *Agilent Gene Expression Microarrays* sind in Kapitel 2.8.2 eingehend erläutert. Die anschließende Integritätskontrolle, deren Durchführung ebenfalls in Kapitel 2.8.2 beschrieben ist, ergab für alle Proben Integritäten zwischen 9,6 und 10, was dem Wert von nahezu vollständig intakter RNA entspricht (Abbildung 21 im Anhang). Alle acht Proben waren nach dieser Qualitätskontrolle für die Verwendung mit einem *Agilent Gene Expression Microarray* geeignet und konnten, nach dem in Kapitel 2.8.3 erläuterten „Labeling“, auf die Microarrays aufgetragen werden. Die Auswertung der Microarrays erfolgte wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben, die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Insgesamt wurden 16 Gene von der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante im Vergleich zum PAO1 Wildtyp differentiell reguliert, wobei eine Regulation über 1,7-fach als signifikant angesehen wurde. Davon waren 10 Gene in der Transposonmutante induziert, 6 lagen hier reprimiert vor. Bei 9 Genen handelte es sich um kodierende Bereiche für hypothetische Proteine. Wie Tabelle 18 zeigt, waren die in der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante am höchsten induziert vorliegenden Gene *sodM*, *orfX* und PA4467. Abbildung 10 zeigt, dass es sich hierbei um diejenigen Gene handelte, die sich im *fumC1/sodM*-Operon direkt hinter dem *fumC1*-Gen befinden. Zunächst lag daher die Vermutung nahe, dass sich diese induzierte Expression mit dem Aufbau der Transposons erklären lässt die für die Transposonmutagenese verwendet worden sind (Jacobs *et al.*, 2003). Am Ende dieser Transposons (*phoA*- oder *lacZ*-Transposon) befand sich ein Promotor (Neomycin Phosphotransferase Promotor), der polare Effekte auf die downstream folgenden Gene minimieren sollte (Jacobs *et al.*, 2003). Da das in PAO1 $\Delta$ *fumC1* verwendete Transposon (*lacZ*) jedoch entgegen der Leserichtung des *fumC1*-Gens eingefügt worden ist (Jacobs *et al.*, 2003), kann dessen endständiger Promotor nicht für die beobachtete erhöhte Expression der nachfolgenden Gene verantwortlich sein. Allerdings liefert diese Beobachtung Hinweise darauf, dass das manipulierte Operon durch die Insertion des Transposons nicht beschädigt wurde. Möglicherweise verursacht das fehlende *fumC1*-Genprodukt eine vermehrte Expression der beschriebenen Gene.

**Tabelle 18:** Differenziell regulierte Gene von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO1 $\Delta$ *fumC1* in AUM unter Tobramycin-Einfluss.

PA-Nr.	Genname	Faktor der Regulation	Funktion
PA4468	<i>sodM</i>	6,19	Superoxiddismutase
PA4469	<i>orfX</i>	5,28	hypothetisches Protein
PA4467		4,66	hypothetisches Protein
PA3530		2,39	hypothetisches Protein
PA4704.2	<i>prfF2</i>	2,28	regulatorische RNA
PA3390		2,10	hypothetisches Protein
PA4704.1	<i>prfF1</i>	1,95	regulatorische RNA
PA3305.1	<i>phrS</i>	1,82	PhrS
PA1501		1,77	hypothetisches Protein
PA3731		1,75	hypothetisches Protein
PA1796.1		-1,82	tRNA-Arg
PA2126		-1,95	hypothetisches Protein
PA4685		-2,07	hypothetisches Protein
PA2127		-2,55	hypothetisches Protein
PA4500		-2,87	Bindeproteindomäne eines ABC-Transporters
PA4496		-2,91	Bindeproteindomäne eines ABC-Transporters

Desweiteren waren in der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante die Gene für die regulatorischen RNAs *prfF1* und *prfF2* 2,28-fach und 1,95-fach induziert. Diese stehen, genau wie das *fumC1/sodM*-Operon unter der regulatorischen Kontrolle des Transkriptionsregulators Fur. (Wilderman *et al.*, 2004). Enthält das Nährmedium Eisen, fungiert dieses als Korepressor und bindet an Fur. Dieser Transkriptionsregulator wird aktiviert und reprimiert verschiedene Gene über die Bindung an einer jeweils upstream gelegenen Fur-Bindebox (Wilderman *et al.*, 2004). Auch *prfF1* und *prfF2* werden auf diese Art von Fur reguliert und damit nur exprimiert, wenn Fur unter Eisenmangelbedingungen inkativ wird. In diesem Fall reprimieren diese regulatorischen RNAs ihrerseits verschiedene Gene (Wilderman *et al.*, 2004). Diese beiden sRNA sind zu > 95 % identisch und unterscheiden sich lediglich durch fünf Nukleotide voneinander. Wie RyhB in *E. coli* sind sie in die Regulation von Genen für die Eisenaufnahmen, Siderophorbildung, Eisenspeicherung und oxidativen Stress involviert (Wilderman *et al.*, 2004). Desweiteren stehen unter anderem einige Gene zur

Vermeidung von Eisentoxizität, Gene eisenhaltiger Proteine wie z. B. Aconitase, Fumarase (FumA und FumB), Succinatdehydrogenase und weitere Proteine des Zitronensäurezyklus unter dieser Kontrolle (Dubrac und Touati, 2000; Niederhoffer *et al.*, 1990). Infolge der Repression durch die beiden sRNAs *prfF1* und *prfF2* sind diese Gene daher indirekt von Fur induziert. Aus *E. coli* ist bereits bekannt, dass die Regulation über die Bindung der beiden sRNAs an die mRNA regulierter Gene und damit deren sofortige Degradation erfolgt (Massé *et al.*, 2003; Geissmann und Touati, 2004; Vecerek *et al.*, 2003). Die Induktion dieser regulatorischen RNAs deutet auf einen, im Vergleich zu PAO1, erhöhten Eisenmangel in der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante hin. Bemerkenswert ist auch, dass somit die Mutation im *fumC1*-Gen über die erhöhte Expression dieser regulatorischen RNAs, eine Repression anderer Zitratzyklus-Gene bewirkte. Die Auswirkungen dieser negativen Regulation weiterer Gene des Zitratzyklus waren allerdings in der getesteten Mutante so gering, dass sie in den Transkriptomanalysen nicht direkt messbar waren.

Die sRNA *phrS* ist mit 1,82-fach nur geringfügig erhöht exprimiert, sie fungiert nach neuesten Erkenntnissen als Aktivator der PqsR Synthese, eines der Schlüsselregulatoren des Quorum sensings (QS) (Sonnleitner *et al.*, 2011). Weiterhin führt eine Überexpression von *phrS* zu einer erhöhten Expression verschiedener Gene der Pyocyanin-Biosynthese (Sonnleitner *et al.*, 2011). Dieser Befund erklärt die im Gegensatz zum PAO1 Wildtyp stärkere grüne Färbung der Kulturen der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante, die in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Da Pyocyanin für seine redoxaktiven Eigenschaften bekannt ist (Reszka *et al.*, 2010) wäre es möglich, dass PAO1 $\Delta$ *fumC1* gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress aufweist. Dieser verbesserte Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies würde nach der in Kapitel 1.5 bereits erläuterten Theorie von Kohanski *et al.* möglicherweise die Antibiotikaresistenz von PAO1 $\Delta$ *fumC1* verstärken. Dies könnte ein erster Hinweis auf einen zugrundeliegenden Mechanismus der erhöhten Antibiotikaresistenz der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante sein.

Einige der hypothetischen Proteine wiesen Homologien zu Proteinen bekannter Funktionen in anderen Pseudomonaden auf, es handelt sich hierbei z. B. um eine Antibiotika-produzierende Monooxygenase (PA3390), eine Hydroxypyruvat-Isomerase (PA1501), ein „phage shock“-Protein (PA3731), einen putativen Transkriptionsregulator (PA2126) und eine Phosphoadenosinphosphosulfat-

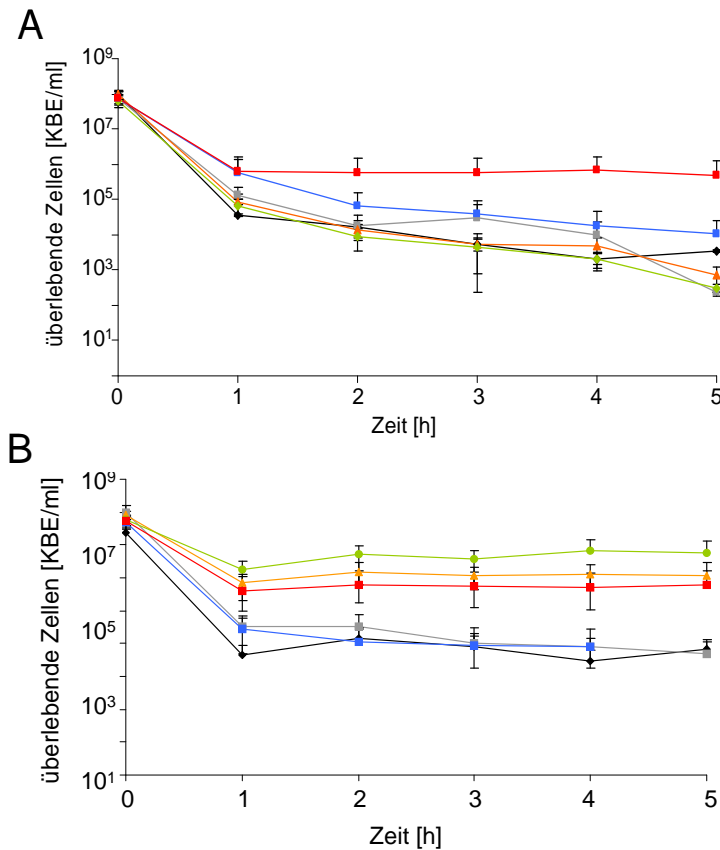
Sulfotransferase (PA2127). Diese Gene sind allerdings, genauso wie die beiden ABC-Transporter-Bindedomänen (PA4500 und PA4496) nur geringfügig differentiell reguliert und besitzen zudem keinen direkten Bezug zur Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa*.

Die größten Veränderungen in der Genexpression in PAO1 $\Delta$ *fumC1* fanden offenbar innerhalb des *fumC1/sodM*-Operons statt. Hier erhöhte sich die Expression der auf *fumC1* folgenden Gene nachweislich. Möglicherweise ist hiermit auch die erhöhte Antibiotikatoleranz der Mutante zu begründen. Es wäre denkbar, dass die am höchsten regulierte Superoxiddismutase SodM aufgrund ihrer Bedeutung im Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* beeinflusst. Wie bereits in Kapitel 1.5 erläutert, hat die Produktion von ROS einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung bakterizider Antibiotika innerhalb der Bakterienzelle (Kohanski *et al.*, 2007). Die Superoxiddismutase SodM, die Mangan als Kofaktor rekrutiert, wird unter Eisenmangelbedingungen (in AUM) gegenüber der SodB, der Eisen als Kofaktor dient, bevorzugt produziert (Hassett *et al.*, 1995). In vorangegangenen Proteomanalysen (Kapitel 3.5) wurde SodM in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilmen unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen erhöht exprimiert gefunden (Rosin, 2011). Desweiteren ist beschrieben, dass Mutationen der Mn-SOD keinen lethalen Phänotyp bewirken, während die Fe-SOD für die Zelle eine größere Bedeutung zu haben scheint (Hassett *et al.*, 1995). Die Effekte einer Deletion oder Überexpression von *sodM* auf die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* waren bis dato noch unerforscht.

### **3.5.11. Antibiotikatoleranz weiterer *P. aeruginosa* Transposonmutanten**

Da nach Auswertung der Transkriptomdaten (Kapitel 3.5.10) Grund zu der Annahme bestand, dass der antibiotikaresistentere Phänotyp der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante evtl. nicht ausschließlich mit einer Funktionslosigkeit der Fumarathyratase FumC1 zu begründen ist, sollten auch Transposonmutanten der anderen Gene des *fumC1/sodM*-Operons (Abbildung 10) auf ihre Antibiotikatoleranz hin untersucht werden. Hierzu wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.5.8) Absterbekurven unter genau den Bedingungen erstellt, unter denen PAO1 $\Delta$ *fumC1* die

erhöhte Antibiotikatoleranz gezeigt hatte. Diese Absterbekurven, für die logarithmischen Kulturen in AUM mit der 5-fachen MIC Tobramycin oder Ciprofloxacin inkubiert wurden, sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** Antibiotikatoleranz planktonischer Kulturen in AUM, die während der logarithmischen Wachstumsphase (1,5 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (A) oder Ciprofloxacin (B) behandelt worden sind. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei von einander unabhängigen Experimenten. schwarz: PAO1, grau: PAO1 $\Delta$ PA4467, blau PAO1 $\Delta$ sodM, orange: PAO1 $\Delta$ orfX, rot: PAO1 $\Delta$ fumC1, grün PAO1 $\Delta$ fagA

Wie in Abbildung 16A zu erkennen ist, zeigte keine der weiteren, hier getesteten Transposonmutanten unter Tobramycin-Einfluss einen Phänotyp der mit dem der PAO1 $\Delta$ fumC1-Transposonmutante vergleichbar wäre. Einzig PAO1 $\Delta$ sodM zeigte im Vergleich zum Wildtyp PAO1 eine leicht erhöhte Tobramycin-Resistenz. Die Tobramycin-Toleranz der anderen getesteten Transposonmutanten bewegte sich nahe der des PAO1 Wildtyps. Im Bezug auf ihre Ciprofloxacin-Toleranz (Abbildung 16B) ließen sich die getesteten Transposonmutanten in zwei Gruppen aufteilen. Die Mutanten PAO1 $\Delta$ PA4467 und PAO1 $\Delta$ sodM verhielten sich wie der PAO1 Wildtyp und starben unter den getesteten Bedingungen bis auf eine Zellzahl von ca.  $1 \times 10^4$  KBE/ml ab. Die

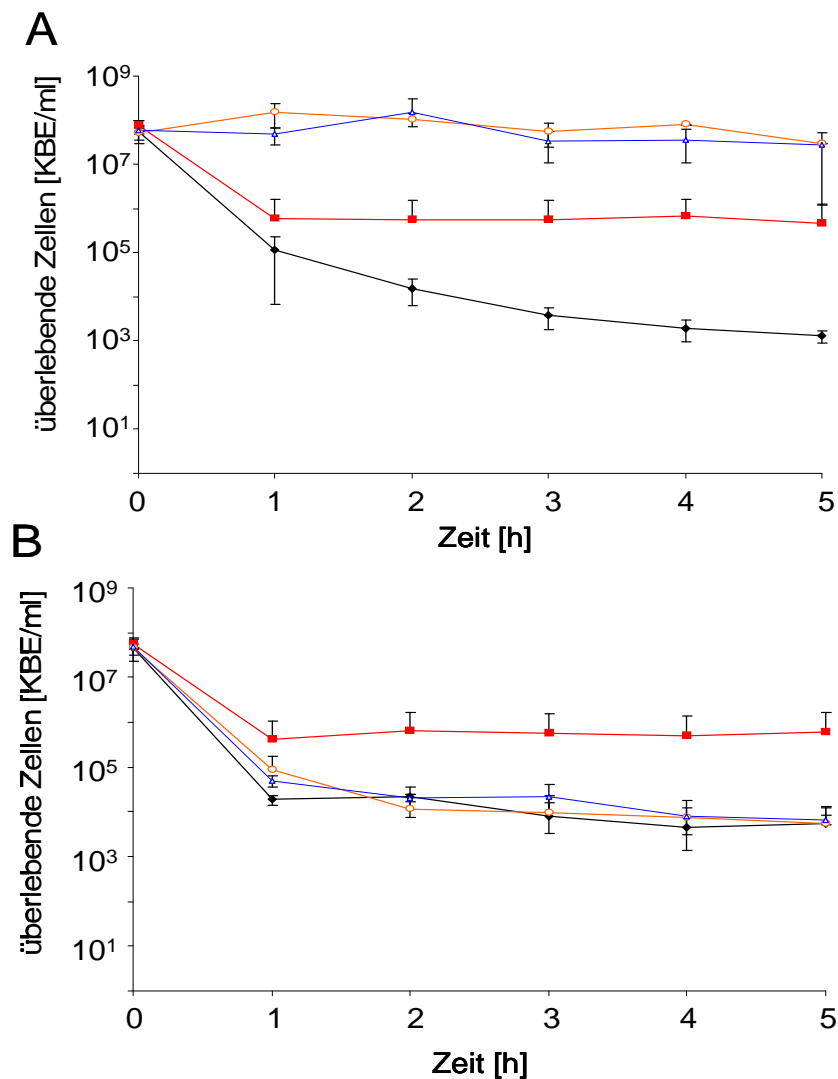


Transposonmutanten PAO1 $\Delta$ *orfX* und PAO1 $\Delta$ *fagA* hingegen zeigten ebenso wie PAO1 $\Delta$ *fumC1* eine deutlich erhöhte Ciprofloxacin-Toleranz und starben lediglich bis auf ca.  $1 \times 10^6$  KBE/ml ab.

Alle Transposonmutanten, die unter diesen Versuchsbedingungen eine erhöhte Resistenz zeigten, tragen das Transposon vor dem *sodM*-Gen. Lag das Transposon im *sodM*-Gen selbst oder dahinter, wie bei der PAO1 $\Delta$ PA4467-Mutante, hatte dies keinen Antibiotikaresistenten Phänotyp zur Folge. Diese Ergebnisse konnten nicht eindeutig zeigen, dass die beobachtete Antibiotikaresistenz der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante von der Mutation im *fumC1*-Gen verursacht wurde. Vielmehr weisen sie auf einen Effekt der in Kapitel 3.5.10 beobachteten erhöhten Expression der Superoxiddismutase SodM und der Gene vor *sodM* hin. Daher sollte die Komplementation der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante im Folgenden Klarheit bringen.

### **3.5.12. Komplementation der antibiotikaresistenten *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante**

Zur abschließenden Aufklärung der Frage, ob tatsächlich das *fumC1*-Gen für den, unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen auftretenden Antibiotika-resistenten Phänotyp verantwortlich ist, wurde wie in Kapitel 2.9 beschrieben ein pBBR1MCS5::*fumC1* Komplementationsplasmid hergestellt. Nachdem dieser Vektor mittels Elektroporation (Kapitel 2.9.8) in *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *fumC1* eingebracht worden war, wurden wie in Kapitel 2.5.8 erläutert Absterbekurven dieses Stammes aufgenommen. Um eventuell Auftretende Beeinflussungen des verwendeten Vektors pBBR1MCS5 identifizieren zu können wurden alle Experimente ebenfalls mit einem Leervektor tragenden PAO1 Wildtyp durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 gezeigt, zum Vergleich sind ebenfalls der PAO1 Wildtyp und die PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante dargestellt. Das *fumC1*-Gen wurde nach seiner Ligation in den pBBR1MCS5-Vektor per PCR-Analyse überprüft (Abbildung 20 im Anhang).



**Abbildung 17:** Antibiotikatoleranz planktonischer Kulturen in AUM, die während der logarithmischen Wachstumsphase (1,5 h) mit der 5-fachen MIC Tobramycin (A) oder Ciprofloxacin (B) behandelt worden sind. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei von einander unabhängigen Experimenten. schwarz: PAO1, rot: PAO1Δ*fumC1*, orange: PAO1Δ*fumC1* + pBBR1MCS5::*fumC1*, blau PAO1 + pBBR1MCS5

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, sind sowohl PAO1Δ*fumC1* + pBBR1MCS5::*fumC1*, als auch PAO1 + pBBR1MCS5 gegenüber Tobramycin resistent. Diese erhöhte Tobramycin Resistenz lässt sich vermutlich mit der im pBBR1MCS5-Vektor enthaltenen Gentamycin-Resistenzkassette erklären. Da es sich bei Gentamycin, wie bei Tobramycin um ein Aminoglykosid handelt, kann es hier zu Resistenzmechanismen kommen, die diese beiden, sehr ähnlichen Antibiotika betreffen. Ciprofloxacin hingegen, dessen Wirksamkeit nicht von der eingesetzten Gentamycin-Resistenzkassette beeinflusst wurde, verursachte in beiden Plasmid-tragenden Stämmen ein Wildtyp-ähnliches Absterbeverhalten (Abbildung 17). Das Wildtyp-ähnliche Verhalten von

PAO1 $\Delta$ *fumC1* + pBBR1MCS5::*fumC1* weist darauf hin, dass es möglich war mit dem eingebrachten *fumC1*-Gen den Antibiotikaresistenten Phänotyp der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante zu komplementieren. Diese Ergebnisse scheinen eindeutige Hinweise auf den genotypischen Hintergrund des zuvor beobachteten Phänotyps zu liefern.

Zur Erklärung des zugrunde liegenden Mechanismus der beobachteten Resistenz der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante gab es unterschiedliche Ansätze. Zunächst lag die Vermutung nahe die Fumarathydratase FumC1 würde möglicherweise die verwendeten Antibiotika auf molekularer Ebene modifizieren. Da der beobachtete Effekt allerdings sowohl bei Aminoglykosiden, als auch bei Fluorchinolonen auftrat und die Fumarathydratase laut Literatur ein sehr spezifisches Enzym ist (Metzler, 2001) schied diese Möglichkeit von vornherein aus. Da der Effekt einer eventuellen Anhäufung von Fumarat in PAO1 $\Delta$ *fumC1* bereits in Kapitel 3.5.8 ausgeschlossen werden konnte, wäre ein weiterer Erklärungsansatz der verbesserte Schutz der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante vor oxidativem Stress. Eine nähere Betrachtung der Level reaktiver Sauerstoffspezies in der PAO1 $\Delta$ *fumC1*- und der PAO1 $\Delta$ *sodM*-Transposonmutante, sowie im PAO1 Wildtyp sollte im Folgenden Klarheit über den oxidativen Stress-Zustand der Zellen unter Antibiotikaeinwirkung bringen.

### **3.5.13. Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während der Inkubation von *P. aeruginosa* mit Antibiotika**

Wie bereits in Kapitel 1.5 eingehend erläutert, wird neben den bekannten Wirkmechanismen von Antibiotika eine zusätzliche Schädigung der Zelle durch die Bildung, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert (Kohanski *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2009). Der zentrale Metabolismus der Zelle und die Produktion von Reduktionsequivalenten (NADH) spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Kohanski *et al.*, 2007). Da die Fumarase FumC1 ein Enzym des Zitratzyklus ist, wurde während dieser Arbeit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter Antibiotikaeinfluss in der PAO1 $\Delta$ *fumC1*- und der PAO1 $\Delta$ *sodM*-Transposonmutante dokumentiert. Laut einer Mutantenstudie von Kohanski *et al.*, 2007, in der die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von Zitronensäurezyklus-Mutanten quantifiziert wurde, nimmt der durch Antibiotika verursachte Sauerstoffstress ab, je früher im Zitratzyklus das defekte

Enzym lokalisiert ist. Eine Mutante mit Defekt im *fumC1*-Gen wurde allerdings in deren Arbeit nicht betrachtet, da bei der Reaktion von Fumarat zu Malat keine Reduktionsequivalenten entstehen. Trotzdem galt es nun zu überprüfen, ob evtl. diese Art der Blockade der Kaskade zur Entstehung von ROS die zuvor beobachtete erhöhte Antibiotikaresistenz verursachen könnte. Auch die mögliche Beeinflussung der Superoxiddismutase SodM würde einen Effekt auf die Menge und Art der gebildeten ROS haben, sodass dieser Test Aufschluss über die Ursache des beobachteten Antibiotikaresistenz-Mechanismus geben könnte.

Wie in Kapitel 2.5.8 beschrieben, wurden *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 $\Delta$ *fumC1* und PAO1 $\Delta$ *sodM* genauso inkubiert wie zuvor für die Absterbeversuche, um nach anschließender Antibiotika-Inkubation die Menge des gebildeten ROS anhand der Chemolumineszenz von Luminol zu quantifizieren (Kapitel 2.6.2).

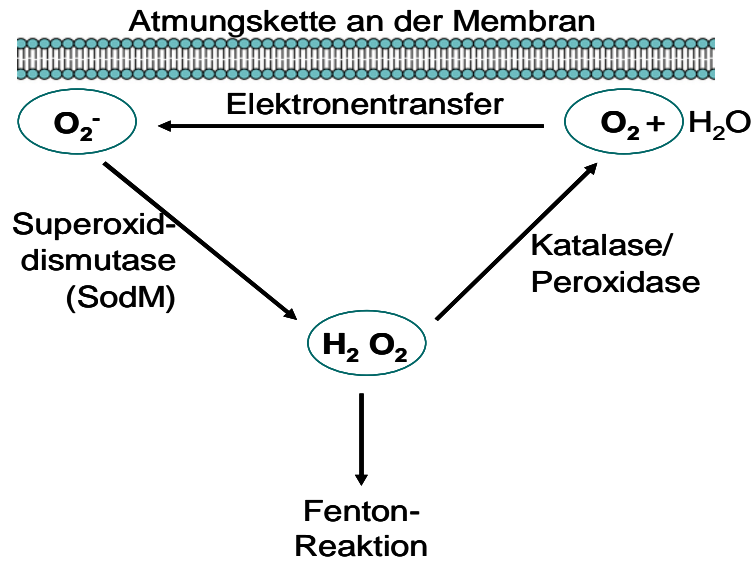
**Tabelle 19:** Quantifizierung von intrazellulären ROS unter dem Einfluss der 5-fachen MIC Tobramycin und Ciprofloxacin in 1:10 LB und AUM mittels Luminol. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Diese Tabelle zeigt die n-fache Veränderung der ROS-Konzentration pro Zelle im Vergleich zur Negativkontrolle des PAO1 Wildtyps in 1:10 LB.

<i>P. aeruginosa</i>			
Antibiotikum	PAO1	PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i>	PAO1 $\Delta$ <i>sodM</i>
1:10 LB			
n-fache Veränderung			
Negativkontrolle	0,0 $\pm$ 0,0	-0,2 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,7
Tobramycin	13,6 $\pm$ 1,2	15,0 $\pm$ 3,1	17,0 $\pm$ 2,9
Ciprofloxacin	14,7 $\pm$ 3,5	16,3 $\pm$ 3,2	16,9 $\pm$ 1,8
AUM			
n-fache Veränderung			
Negativkontrolle	-3,1 $\pm$ 1,0	-1,7 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 0,2
Tobramycin	3,4 $\pm$ 1,7	6,3 $\pm$ 1,0	8,5 $\pm$ 0,9
Ciprofloxacin	5,7 $\pm$ 1,9	8,3 $\pm$ 0,7	10,6 $\pm$ 0,7

Wie in Tabelle 19 zu sehen ist, lösten sowohl Tobramycin als auch Ciprofloxacin eine deutlich messbare Bildung von ROS in *P. aeruginosa* aus. In 1:10 LB-Medium erhöhte sich die Menge der gebildeten ROS pro Zelle sowohl im PAO1 Wildtyp als auch in den PAO1 $\Delta$ *fumC1*- und PAO1 $\Delta$ *sodM*-Transposonmutanten um das 14- bis 16-fache. In diesem Medium unterschieden sich die gebildeten ROS-Mengen zwischen Mutanten

und Wildtyp nicht messbar und auch die getesteten Antibiotikaklassen hatten hier denselben Effekt. Diese Ergebnisse entsprachen denen, der vorangegangenen Absterbekurven, die in Kapitel 3.5.4.1 dargestellt sind. In AUM war die Menge der gebildeten ROS pro Zelle wesentlich geringer, die getesteten *P. aeruginosa*-Stämme PAO1, PAO1 $\Delta$ *fumC1* und PAO1 $\Delta$ *sodM* produzierten hier 2- bis 3-fach weniger ROS als in 1:10 LB. Auch diese Ergebnisse spiegelten das zuvor beobachtete verbesserte Überlebens in AUM (Kapitel 3.5.4.1) wieder. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Tatsache, dass der Gehalt von Eisen, welches die Bildung von ROS über die Fenton-Reaktion verstärkt (Chiancone *et al.*, 2004) in AUM geringer ist als in 1:10 LB-Medium. Der unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen herrschende Eisenmangel schützt *P. aeruginosa* daher in gewisser Weise durch eine verringerte Fenton-Reaktion vor übermäßiger ROS Produktion. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass der Einfluss von Eisen auf die Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen bereits in Kapitel 3.5.7.1 gezeigt werden konnte. Außerdem sind unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen laut Transkriptomanalysen (Rosin, 2011) im *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp einige Gene stärker exprimiert, die eine Rolle innerhalb der Antwort von *P. aeruginosa* auf oxidativen Stress spielen. Unter diesen Bedingungen sind daher möglicherweise Proteine zur Stressantwort bereits funktionsbereit und es kann somit von *P. aeruginosa* umgehend adäquat auf die Zugabe von Antibiotika reagiert werden. Womit die AUM-abhängige erhöhte Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* möglicherweise auf eine erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress zurückgeführt werden kann.

Desweiteren reagierte die PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen tendenziell stärker auf die Antibiotikazugabe als der PAO1 Wildtyp, die gemessene ROS-Menge (Tabelle 19) schien hier leicht erhöht. Dies steht im Widerspruch zu der vorher beobachteten erhöhten Antibiotikaresistenz der Mutante, wobei die hier aufgezeichnete Erhöhung der Werte gering ist. Die Transposonmutante PAO1 $\Delta$ *sodM* hingegen zeigte in AUM im Vergleich zum PAO1 Wildtyp eine deutlich erhöhte ROS-Menge innerhalb der Zelle. Da die hier ausgeschaltete Superoxiddismutase das erste Enzym im Prozess zum Abbau von ROS darstellt, ist die PAO1 $\Delta$ *sodM*-Transposonmutante scheinbar nicht im Stande die unter Antibiotikaeinfluss entstehenden ROS zu eliminieren. Der Zusammenhang dieser Prozesse ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Vermeidung von oxidativem Stress innerhalb der Prokaryotischen Zelle. Die während der aeroben Zellatmung entstehenden ROS werden zunächst von der Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt und anschließend von Katalasen und Peroxidasen zu unschädlichem Sauerstoff umgewandelt.

SodM setzt hierbei die während der Zellatmung gebildeten Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) um, welches dann von Katalasen und Peroxidasen weiter abgebaut werden kann. In 1:10 LB übernahm offenbar die SodB von *P. aeruginosa* die Funktion der defekten SodM, das Level der gebildeten ROS war daher mit dem des PAO1 Wildtyps vergleichbar.

Wäre die PAO1 $\Delta$ sodM-Transposonmutante tatsächlich in AUM nicht in der Lage ROS wie dargestellt abzubauen, dann müsste PAO1 $\Delta$ sodM allerdings in den Absterbekurven (Kapitel 3.5.4.1) empfindlicher auf die Antibiotikazugabe reagieren als der Wildtyp PAO1. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass das verwendete Transposon in dieser Mutante zu nahe am Ende des *sodM*-Gens oder sogar außerhalb des Gens platziert ist. Was dazu führen würde, dass die Superoxiddismutase ganz oder noch teilweise von *P. aeruginosa* synthetisiert werden kann. Dies würde die widersprüchlichen Ergebnisse erklären.

Mit den beschriebenen, Plasmid tagenden, Stämmen PAO1 + pBBR1MCS5 und PAO1 $\Delta$ fumC1+ pBBR1MCS5::*fumC1* sollte anschließend wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben ebenfalls eine Quantifizierung der ROS durchgeführt werden. Es sollte überprüft werden, ob sich die Komplementation der Mutation in *fumC1* auf die Menge

der gebildeten ROS auswirkt. Die Ergebnisse dieser, ausschließlich in AUM durchgeführten, Experimente sind in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20:** Quantifizierung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies unter dem Einfluss der 5-fachen MIC Tobramycin und Ciprofloxacin in AUM mittels Luminol. Während dieser Experimente wurden neben dem *P. aeruginosa* PAO1 Laborstamm mit pBBR1MCS5-Leervektor auch PAO1 $\Delta$ *fumC1* + pBBR1MCS5::*fumC1* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei von einander unabhängigen Experimenten. Diese Tabelle zeigt die n-fache Veränderung der ROS-Konzentration pro Zelle im Vergleich zur Negativkontrolle des PAO1 Wildtyps in 1:10 LB.

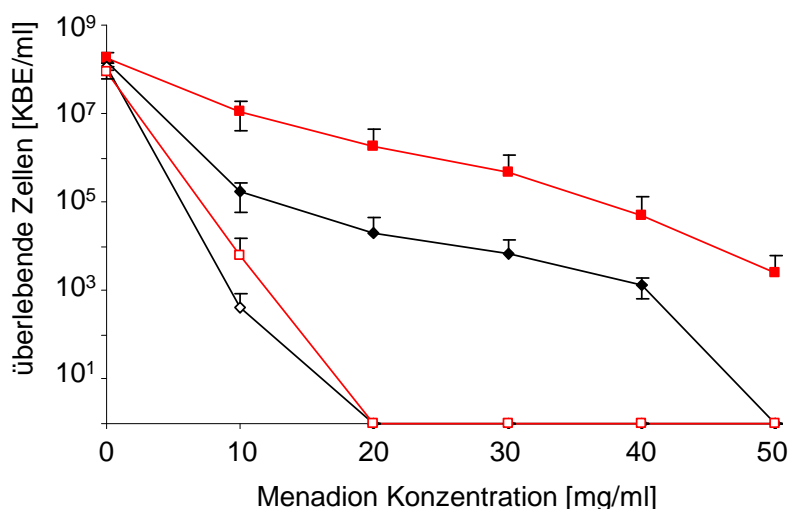
Antibiotikum	<i>P. aeruginosa</i>	
	PAO1 + pBBR1MCS5	PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i> + pBBR1MCS5:: <i>fumC1</i>
	n-fache Veränderung	
Negativkontrolle	0,5 $\pm$ 1,4	-0,3 $\pm$ 1,4
Tobramycin	-0,1 $\pm$ 2,5	-2,6 $\pm$ 1,3
Ciprofloxacin	11,0 $\pm$ 2,5	11,5 $\pm$ 1,5

Während die ROS-Level der Negativkontrollen dem PAO1 Wildtyp ähnlich waren, reagierten die Komplementanten nicht mit messbarer ROS-Bildung auf das Aminoglykosid Tobramycin. Wie die in Abbildung 17 beobachtete Resistenz gegenüber Tobramycin, ist auch dieser Effekt mit der verwendeten Gentamicin-Resistenzkassette zu erklären. Scheinbar verhindert die Gentamicinresistenz ebenfalls die Wirkung von Tobramycin auf die in Kapitel 1.5 erläuterten Prozesse rund um die Fenton-Reaktion.

Die nach Inkubation mit Ciprofloxacin gemessenen ROS-Werte sind, verglichen mit der Negativkontrolle, in beiden Stämmen ca. 11-fach erhöht. Die Reaktion des PAO1 Wildtyps auf dieses Fluorchinolon hingegen hatte eine ca. 6-fache Erhöhung der ROS-Bildung zur Folge. Da diese vergleichsweise hohe ROS-Bildungsrate sowohl in der Komplementante, als auch in dem Stamm mit dem Leervektor auftrat, liegt die Begründung hierfür vermutlich auf dem verwendeten pBBR1MCS5-Vektor. Ob es sich hierbei um einen Effekt handelt, der durch die Gentamicin-Resistenzkassette verursacht wurde bleibt nach diesem Experiment allerdings offen. Auf die Antibiotikatoleranz innerhalb der in Kapitel 3.5.12 dargestellten Absterbekurven hatte dieses Phänomen allerdings keinen Einfluss.

### 3.5.14. Einfluss des Sauerstoffradikalbildners Menadion auf die *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante

Der Einfluss von oxidativem Stress auf das Absterbeverhalten von *P. aeruginosa* sollte während dieser Experimente durch die Zugabe von Menadion nachgestellt werden. Hierzu wurden der *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp und die PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante wie in Kapitel 2.5.13 beschrieben nach ihrer Anzucht (ü. N. in 1:10 LB oder AUM) in PBS-Puffer mit 0 mg/ml bis 50 mg/ml Menadion inkubiert. Hierbei löst Menadion in Bakterien die Bildung von Superoxidradikalen und damit oxidativen Stress aus (Geenberg *et al.*, 1991). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt und zeigen deutlich, dass das Nährmedium bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle zu spielen scheint.



**Abbildung 19:** Verhalten von *P. aeruginosa* unter Menadion-Einfluss. Wie in Kapitel 2.5.13 beschrieben wurden verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme nach ihrer Anzucht in 1:10 LB-Medium (offene Symbole) oder AUM (gefüllte Symbole) in PBS-Puffer mit verschiedenen Menadion-Konzentrationen 4 h bei 37 °C inkubiert. Bei den Ergebnissen der anschließend durchgeführten KBE-Bestimmung (Kapitel 2.5.5) handelt es sich um die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. schwarz: PAO1, rot PAO1 $\Delta$ *fumC1*

Während die in 1:10 LB-Medium angezogenen *P. aeruginosa*-Kulturen bereits bei Menadion-Konzentrationen von 20 mg/ml vollständig abgestorben waren, überlebten Zellen, die in AUM herangewachsen sind wesentlich höhere Konzentrationen Menadions. Die bereits in Kapitel 3.5.13 beschriebene veränderte Reaktion von *P. aeruginosa* auf oxidativen Stress unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen lässt sich



auch während dieser Experimente beobachten. Damit konnte ein weiterer deutlicher Hinweis darauf erhalten werden, dass die erhöhte Antibiotikaresistenz unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen mit der erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress zusammenhängt. Die Erklärung hierfür könnte neben der bereits erwähnten erhöhten Expression einiger Gene zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (Kapitel 3.5.13), der Eisenmangel in AUM sein. Eine verringerte Verfügbarkeit von Eisen, würde möglicherweise die in Kapitel 1.5 erläuterte Fenton-Reaktion und somit die übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies blockieren. Die damit verbundene Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden wäre somit verringert.

Desweiteren unterschied sich die Reaktion von *P. aeruginosa* PAO1 auf das hinzugefügte Menadion deutlich von der der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante wenn beide zuvor in AUM angezogen worden waren. Während der PAO1 Wildtyp Menadion-Konzentrationen von mehr als 50 mg/ml nicht überlebte, zeigte die PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante ein ca. 100-fach verbessertes Überleben in allen getesteten Menadion-Konzentrationen. Genau wie zuvor (Kapitel 3.5.4.1) war dieser resistente Phänotyp der PAO1 $\Delta$ *fumC1*-Transposonmutante ausschließlich unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu beobachten. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die Eisenabhängigkeit dieses Effektes sein. Aus welchem Grund aber ein Enzym des Zitronensäurezyklus diesen Effekt hat, konnte nicht abschließend geklärt werden und sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

## 4. Zusammenfassung

*P. aeruginosa* ist im Bezug auf Harnwegsinfektionen ein problematischer Keim. Um Grundlagen für eine effiziente Therapie zu schaffen wurden die Antibiotikaresistenzen 32 klinischer *P. aeruginosa*-Isolate aus einer Klinik und einer niedergelassenen urologischen Praxis charakterisiert. Ein Schwerpunkt wurde hierbei auf das Biofilmwachstum unter Harnwegs-ähnlichen, Infektions-relevanten Bedingungen gelegt. Die Steigende Anzahl multiresistenter *P. aeruginosa*-Stämme innerhalb der letzten Jahre und im Verlauf chronischer Infektionen wurde hierbei besonders beachtet.

Die zur Charakterisierung der Antibiotikaresistenz-Mechanismen durchgeführten Antibiotikatoleranz-Studien mit Tobramycin und Ciprofloxacin zeigten deutlich, dass *P. aeruginosa* im Biofilm wesentlich höhere Antibiotikatoleranzen aufweist, als während des planktonischen Wachstums. Sowohl anaerobe- als auch Harnwegs-ähnliche Bedingungen erhöhten die Antibiotikatoleranz der *P. aeruginosa*-Zellen deutlich. Weitere Unterschiede in der Antibiotikatoleranz wurden zwischen dem Laborstamm PAO1 und verschiedenen Harnwegsisolaten beobachtet. Zur Aufklärung der Resistenz-Mechanismen wurden Mutantenstudien durchgeführt. Eine Mutation im *fumC1*-Gen von *P. aeruginosa* PAO1 erwies sich als besonders Resistenz-fördernd.

Die erhöhte Antibiotikatoleranz von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen war Eisen-abhängig. Der im AUM herrschende Eisenmangel behindert möglicherweise die Eisen-abhängige Fenton-Reaktion und damit die durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden. Entsprechend gab es Hinweise auf eine weniger stark erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von *P. aeruginosa* unter Antibiotikaeinfluss in AUM. Diese Umstände führten unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu einem verbesserten Überleben von *P. aeruginosa* während einer Antibiotikabehandlung.

Zusammengefasst tragen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zum molekularen Verständnis der Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* während einer Harnwegsinfektion bei und bereiten so den Weg zur gezielteren Therapie.

## 5. Ausblick

Aufgrund der gewonnenen Kenntnisse über die Antibiotikaresistenzen von *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen, sollten zunächst weitere Experimente bezüglich der Wirkung und Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durchgeführt werden. Es wäre wichtig die genauen Mechanismen dieser Wirkung von Antibiotika zu kennen um den Gründen für Antibiotikaresistenzen begegnen zu können. Auf der Grundlage solcher Daten könnte möglicherweise die Therapie komplizierter Harnwegsinfektionen mit Beteiligung von *P. aeruginosa* verbessert werden.

Auch wäre es interessant entsprechende Versuche mit weiteren in der Therapie eingesetzten Antibiotika durchzuführen und z. B. die Wirkung von Meropenem oder Imipenem auf *P. aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen zu beobachten und die Resistenzmechanismen gegen diese Antibiotika-Klassen aufzuklären. Da sich in dieser Arbeit gezeigt hat wie unterschiedlich verschiedene *P. aeruginosa*-Isolate sind, sollten weitere *P. aeruginosa*-Stämme in diese Untersuchungen einbezogen werden, um die stammspezifischen Reaktionen auf die verschiedenen Antibiotika untereinander vergleichen zu können.

Desweiteren sollte der genaue Mechanismus der Antibiotikaresistenz der *fumC1*-Mutante aufgeklärt werden. Möglicherweise würden biochemische Untersuchungen mit gereinigtem Protein Hinweise auf diese Vorgänge liefern. Sicher wäre es außerdem interessant die Funktionen der restlichen Gene des *fumC1/sodM*-Operons zu kennen und ihren Einfluss auf diesen Antibiotika-resistenten Phänotyp von *P. aeruginosa* zu charakterisieren.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Ablauf der Biofilmbildung bei <i>P. aeruginosa</i> .....	4
<b>Abbildung 2:</b> Der menschliche Harnweg .....	7
<b>Abbildung 3:</b> Wirkorte verschiedener Antibiotika. ....	10
<b>Abbildung 4:</b> Antibiotikaresistenzen, 32 klinischer <i>P. aeruginosa</i> -Harnwegs isolate ...	44
<b>Abbildung 5:</b> Absterbeverhalten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Planktonische Kulturen in exponentieller Wachstumsphase).....	55
<b>Abbildung 6:</b> Absterbeverhalten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1. (Planktonische Kulturen in Stationärphase).....	57
<b>Abbildung 7:</b> Absterbeverhalten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1(Biofilme).....	58
<b>Abbildung 8:</b> Absterbekurven planktonischer Kulturen (Transposonmutanten).....	68
<b>Abbildung 9:</b> Alginate-Konzentration in <i>P. aeruginosa</i> -Filterbiofilmen.....	73
<b>Abbildung 10:</b> Das Operon, in dem das <i>fumC1</i> Gen lokalisiert ist .....	78
<b>Abbildung 11:</b> Absterbekurven planktonischer Kulturen in Eisen-freiem 1:10 LB .....	79
<b>Abbildung 12:</b> Absterbekurven planktonischer Kulturen in AUM mit FeSO <sub>4</sub> .....	81
<b>Abbildung 13:</b> Absterbekurven planktonischer Kulturen .....	83
<b>Abbildung 14:</b> Absterbekurven planktonischer PAO1-Kulturen mit Fumarat.....	84
<b>Abbildung 15:</b> Beispielhafte Abbildung eines Scatterplots der Metabolomanalyse. ....	86
<b>Abbildung 16:</b> Absterbekurven weiterer Transposonmutanten .....	93
<b>Abbildung 17:</b> Absterbekurven der Kopmlementanten .....	95
<b>Abbildung 18:</b> Schematische Darstellung der Vermeidung von oxidativem Stress.....	99
<b>Abbildung 19:</b> Absterbeverhalten von <i>P. aeruginosa</i> unter Menadion-Einfluss.....	101
<b>Abbildung 20:</b> Agarosegel einer Kontroll-PCR.....	119
<b>Abbildung 21:</b> Qualitätskontrolle der RNA.....	120

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Geräte .....	17
<b>Tabelle 2:</b> Beschreibung verwendeter Bakterien-Stämme und Transposonmutanten ...	24
<b>Tabelle 3:</b> Beschreibung verwendeter klinischer <i>P. aeruginosa</i> -Isolate .....	25
<b>Tabelle 4:</b> Beschreibung der verwendeten Plasmide .....	26
<b>Tabelle 5:</b> Beschreibung der verwendeten Primer .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Anzahl der Antibiotikaresistenzen 32 klinischer <i>P. aeruginosa</i> -Isolate .....	45
<b>Tabelle 7:</b> Antibiotikastabilitäts-Test .....	48
<b>Tabelle 8:</b> Minimale Inhibierungskonzentrationen (MIC) .....	50
<b>Tabelle 9:</b> MICs für Biofilme der <i>P. aeruginosa</i> Harnwegs isolate .....	53
<b>Tabelle 10:</b> Absterberaten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Filterbiofilmen .....	60
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung der Proteine aus einer Proteomanalyse mit Biofilmen .....	63
<b>Tabelle 12:</b> Quantifizierung des Wachstums von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und den Transposonmutanten .....	64
<b>Tabelle 13:</b> MIC von Tobramycin and Ciprofloxacin der <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und davon abgeleiteten Transposonmutanten .....	65
<b>Tabelle 14:</b> MIC für Biofilme von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und Transposonmutanten .....	66
<b>Tabelle 15:</b> Absterberaten von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und Transposonmutanten (Biofilme) .....	70
<b>Tabelle 16:</b> Diffusionskontrolle der Antibiotika Tobramycin und Ciprofloxacin. ....	75
<b>Tabelle 17:</b> Differentiell produzierte Metabolite von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i> .....	87
<b>Tabelle 18:</b> Differentiell regulierte Gene von PAO1 $\Delta$ <i>fumC1</i> .....	90
<b>Tabelle 19:</b> Quantifizierung von intrazellulären ROS .....	97
<b>Tabelle 20:</b> Quantifizierung von intrazellulären ROS (Komplementanten) .....	100
<b>Tabelle 21:</b> Antibiotikaresistenz-Profile der 32 <i>P. aeruginosa</i> -Isolate .....	120

## 8. Literaturverzeichnis

Andrews, J. M., Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5-16, 2001.

Anwar, H., Strap, J. L. und Costerton, J. W., Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July:1347-1351, 1992.

Bjarnsholt, T., Jensen, P., Rasmussen, T., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H., Rygaard, J., Moser, C., Eberland, L., Høiby, N. und Givskov, M., Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 3873-3880, 2005.

Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. und Jadeja, L., Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases*, March:279-313, 1983.

Bonomo, R. A. und Szabo, D., Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 49-56, 2006.

Boriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D. und Stewart, P., Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July:2659-2664, 2004.

Borriello, G., Richards, L., Ehrlich, G. D. und Stewart, P., Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:382-384, 2006.

Bottomley, M., Muraglia, E., Bazzo, R. und Carfi, A., Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *The Journal of biological chemistry*., 13592-13600, 2007.

Breidenstein, E. B., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage, J. und Hancock, R. E., Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:4486-4491, 2008.

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J., *Biology of Microorganisms* Pearson Prentice Hall, 2006.

Brooks, T. und Keevil, C. W., A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 24:203-206, 1997.

Costerton, J. W., Cheng, K., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. und Marrie, T., Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews of Microbiology*, 435-464, 1987.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. und James, G., Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176:2137-2142, 1994.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. und O'Toole, G. A., Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, Feb.:1027-1036, 2003.
- Defez, C., Fabbro-Peray, P., Bouziges, N., Gouby, A., Mahamat, A., Daures, J. und Sotto, A., Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection*, 2004.
- Deretic, V., Dikshit, R., Konyecsni, W., Chakrabarty, A. und Misra, T., The algR gene, which regulates mucoidy *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *Journal of Bacteriology*, Mar.:1278-1283, 1989.
- Diggle, S. P., Cornelis, P., Williams, P. und Cámara, 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *International Journal of Medical Microbiology*, 296:83-91, 2006.
- Donlan, R. M. und Costerton, J. W., Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 167-193, 2002.
- Dubrac, S. und Touati, D., Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the sodB promoter. *Journal of Bacteriology*, Jul.:3802-3808, 2000.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A. und Collins, J. J., Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistane. *Current opinion in microbiology*, Oct.:482-489, 2009.
- Egberts, J. und Soenderhuizen, W., Urine samples before dinner are preferable when studying changes in endogenous nitrate production under uncontrolled dietary conditions. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry*, Oct.:141-148, 1996.
- Ellis, G., Yazdanpanah, M. und Makela, S., Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry*, Jun.:195-220, 1998.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D. und Schobert M., Longterm anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*, 4596-4604, 2004.
- Evans, L. R. und Linker, A., Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, Nov.:915-924, 1973.
- Filloux, A., Hachani, A. und Bleves, S., The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, Jun.:1570-1583, 2008.

- Geenberg, J. T., Chou, J. H., Monach, P. A. und Dempf, B., Activation of oxidative stress genes by mutations at *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, July:4433-4439, 1991.
- Geissmann, T. und Touati, D., Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *The EMBO Journal*, Jan.:396-405, 2004.
- Gentleman, R. C., Carey, V., Bates, D., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. und Zhang, J., Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5:2004.
- Ghigo, J. M., Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Research in Microbiology*, 154:1-8, 2003.
- Giamarellou, H., Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36:50-54, 2010.
- Giannakopoulos, X., Evangelou, A., Kalfakakou, V., Grammeniatis, E., Papandropoulos, I. und Charalambopoulos, K., Human bladder urine oxygen content: implications for urinary tract diseases. *International urology and nephrology*, 393-401, 1997.
- Gordon, C. A., Hodges, N. A. und Marriott, C., Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Nov.:667-674, 1988.
- Grobe, S., Wingender, J. und Flemming, H., Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Nov.:139-142, 2001.
- Grobe, S., Wingender, J. und Trüper, H. G., Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *Journal of Applied Microbiology*, März:94-102, 1995.
- Hassett, D. J., Schweizer, H. und Ohman, D., *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *Journal of Bacteriology*, Nov.:6330-6337, 1995.
- Hassett, D., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S., Rowe, J., Yoon, S., Hillard, G., Parvatiyar, K., Kamani, M., Wozniak, D., Hwang, S., McDermott, T. und Ochsner, U. A., Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Dec.:1425-1443, 2002.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J., Riedel, K., Rasmussen, T., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W.,



- Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby, N. und Givskov, M., Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *European Molecular Biology Organization*, 22:3803-3815, 2003.
- Henwood, C. J., Livermore D. M.; James, James, D. und Warner, M., Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Juni:789-799, 2001.
- Heydorn, A., Ersboll, B., Hentzer, M., Parsek, M. R., Givskov, M. und Molin, S., Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology*, Oct.:2409-2415, 2000.
- Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M. R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. und Molin, S., Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied Environmental Microbiology*, 2008 – 2017, 2002.
- Hill, D., Rose, B., Pajkos, A., Robinso, M., Bye, P., Bell, S., Elkins, M., Thompson, B., MacLeod, C., Aaron, S. D. und Harbour, C., Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, Oktober:5085-5090, 2005.
- Hoyle, B. und Costerton, J. W., Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in drug research*, 91-105, 1991.
- Hryniewicz, K., Szczypa, K., Sulikowska, A., Jankowski, K., Betlejewska, K. und Hryniewicz, W., Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Poland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47:773-780, 2001.
- Jacobs, M., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. und Manoil, C., Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Nov.:14339-14344, 2003.
- Jorgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Lazdunski, A., Williams, P. und Steward, G. S., RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 835-844, 1999.
- Kim, Y. und Wood, T., Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jan.:2009-213, 2009.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. und Collins, J. J., A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130:797-810, 2007.

- Kwon, D. H. und Lu, C., Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1615-1622, 2006.
- Lambert, P., Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95:22-26, 2002.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. und Lazdunski, A., A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology*, 21:1137-1146, 1996.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. und Kong, F., The role of Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 599-606, 2004.
- Lewis, K., Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews. Microbiology*, Jan.:48-56, 2007.
- Livermore D. M., beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews.*, Oct.:557-584, 1995.
- Lizewski, S. E., Schurr, J. R., Jackson, D. W., Frisk, A., Carterson, A. J. und Schurr, M. J., Identification of AlgR-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by use of microarray analysis. *Journal of Bacteriology*, 5672-5684, 2004.
- Lu, C., Itoh, Y., Nakada, Y. und Jiang, Y., Functional analysis and regulation of the divergent spuABCDEF GH-spuI operon for polyamine uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 3765-3773 3765-3773, 2002.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J., Ramseier, T. und Saier Jr., M., Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Apr.:223-233, 2003.
- Mah, T. F. und O'Toole, G. A., Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 34-39, 2001.
- Mann, S., Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 184-190, 1966.
- Manski, D., Urologielehrbuch, [www.urologielehrbuch.de](http://www.urologielehrbuch.de), 2008.
- Massé, E., Escorcia, F. und Gottesman, S., Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, Oct.:2374-2383, 2003.
- Metzler, D. E., *Biochemistry- The Chemical Reactions of Living Cells* Harcourt Academic Press, 2001.

- Mims, C., Dockrell, H. M., Goering, R. V., Roitt, I., Wakelin, D. und Zuckermann, M., *Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie* Urban und Fischer Verlag, 2006.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S. und Harjai, K., Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *Journal of Infection and Public Health*, 101-111, 2009.
- Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S. und Harjai, K., Iron dictates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infections. *Journal of Biomedical Sciences*, 731-741, 2008.
- Möker, N., Dean, C. und Tao, J., *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of Bacteriology*, Apr.:1946-1955, 2010.
- Nakae, T., Outer membrane permeability of bacteria. *Clinical Reviews in Microbiology*, 13:1-62, 1986.
- Narten, M., Charakterisierung der Antibiotika-Resistenz-Mechanismen von *Pseudomonas aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen., 2009.
- Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P. und Walmsley, H. L., Inhibition of Tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr.:518-523, 1988.
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. und Costerton, J. W., Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 619-624, 1985.
- Niederhoffer, E., Naranjo, C., Bradley, K. und Fee., Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *Journal of Bacteriology*, Apr.:1930-1938, 1990.
- Nikolskaya, A. und Galperin, M., A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Research*, Jun.:2453-2459, 2002.
- O'Toole, G. A. und Kolter, R., Flagella and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, Oct.:295-304, 1998.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R. und Jung, R., National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:4606-4610, 2004.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R. und Jung, R., Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*, 1353-1364, 2005.

- Ochsner, U. A., Johnson, Z. und Vasil, M. L., Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, Jan.:185-198, 2000.
- Palmer, K., Brown, S. und Whiteley, M., Membrane-bound nitrate reductase is required for anaerobic growth in cystic fibrosis sputum. *Journal of Bacteriology*, Jun.:4449-4455, 2007.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. und Iglewski, B. H., Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, Sept.:5756-5767, 1997.
- Pesci, E. C. und Iglewski, B. H., Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Cell-cell signaling in bacteria. *ASM Press*, 1999.
- Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. und Ohman, D. E., Role of alginate acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infection and Immunity*, 1895-1901, 2001.
- Plosker, G. L., Aztreonam lysine for inhalation solution in cystic fibrosis. *Drugs*, 70:1843-1855, 2010.
- Plotkowski, M. C., Póvoa, H. C., Zahm, J. M., Lizard, G., Pereira, G. M., Tournier, J. M. und Puchelle, E., Early mitochondrial dysfunction, superoxide anion production and dna degradation are associated with non-apoptotic death of human airway epithelial cells induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 617-626, 2002.
- Pschyrembel, W., *Pschyrembel-Klinisches Wörterbuch*, de Gruyter, 2004.
- Quale, J., Bratu, S., Gupta, J. und Landman, D., Interplay of efflux systems, *ampC*, and *oprD* expression in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May:1633-1641, 2006.
- Raja, N. S. und Singh, N. N., Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 40:45-49, 2007.
- Rasmussen, T., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Köté, M., Nielsen, J., Eberl, L. und Givskov, M., Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology*, 1799-1814, 2005.
- Rehm, B. H. und Winkler, U. K., Alginatbiosynthese bei *P. aeruginosa* und *A. vinelandii*: Molekularbiologie und Bedeutung, volume 2. *Biospektrum*, 1996.
- Remminghorst, U. und Rehm, B., In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, Jan.:298-305, 2006.

- Reszka, K., Bilski, P. und Bitigan, B., Quenching of singlet oxygen by pyocyanin and related phenazines. *Photochemistry and Photobiology*, Apr.:742-746, 2010.
- Rivera-Sanchez, R., Delgado-Ochoa, D., Flores-Paz R. R.; Garcia-Jimenez, Garcia-Jimenez, E., Espinosa-Hernandez, R., Bazan-Borges, A. und Arriaga-Alba, M., Prospective study of urinary tract infection surveillance after kidney transplantation. *BMC Infectious Diseases*, 10:245, 2010.
- Ronald, A., The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *American Journal of Medicine*, 14S-19S, 2002.
- Rosin, N., Physiologie von *Pseudomonas aeruginosa* unter Harnwegs-ähnlichen Bedingungen., 2011.
- Rossolini, G. M. und Mantengoli, E., Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11:17-32, 2005.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W. und Prince, A. S., Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1209-1223, 2005.
- Saha, R., Jain, S. und Kaur, I. R., Metallo beta-lactamase producing *pseudomonas* species--a major cause of concern among hospital associated urinary tract infection. *Journal of the Indian Medical Association*, 108:344-348, 2010.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. und Davies, D. G., *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, Feb.:1140-1154, 2002.
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. und Hamood, A. N., Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 841-853, 2004.
- Schertzer, J. W., Brown, S. A. und Whiteley, M., Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Molecular Microbiology*, 77:1527-1538, 2010.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert M.; Jahn, und Jahn, D., The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *Journal of Bacteriology*, 4310-4314, 2007.
- Schulte, S., Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid gegenüber Bakterien., 2003.
- Schuster, M., Lostroh, C., Ogi, T. und Greenberg, E. P., Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, Apr.:2066-2079, 2003.
- Schwarzmann, S. und Boring III, J. R., Antiphagocytic effect of slime from mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 762-767, 1971.

Shigemura, K., Arakawa, S., Sakai, Y., Kinoshita, S., Tanaka, K. und & Fujisawa, M., Complicated urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in a single institution (1999-2003). *International Journal of Urology*, 13:538-542, 2006.

Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A., Backofen, R., Williams, P., Hüttenhofer, A., Haas, D. und Bläsi, U., The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Molecular Microbiology*, May:868-885, 2011.

Spoering, A. und Lewis, K., Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, Dec.:6746-6751, 2001.

Stickler, D., Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling*, 293-305, 1996.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. und Costerton, J. W., Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews of Microbiology*, 187-209, 2002.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D. W. P., Hickey, M., Brinkmann, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K. L. R., Smith, K., Sencer, D., Wong, G., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. und Olson, W., Complete genome sequence of *P. aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 947-948, 2000.

Suman, E., Blat, K. und Hegde, B., Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infection. *Tropical doctor*, Oct.:180-181, 1993.

Tenke, P., Kovacs, B., Jäckel, M. und Nagy, E., The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*, Feb.:13-20, 2006.

Thudichum, J. L., Urochrome:the colouring matter of urine. *British Medical Journal*, 509-519, 1864.

Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Schobert M.; Wiehlmann, Wiehlmann, L. und Jahn, D., Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *International Journal of Medical Microbiology*, Apr.:282-292, 2010.

Tkachenko, A. G., Nesterova, L. und Pshenichnov, M., The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, Jul.:155-157, 2001.

Tseng, CP., Yu, CC., Lin, HH., Chang, CY. und Kuo, JT., Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB and FumC) activity. *Journal of Bacteriology*, Jan.: 461-467, 2001.

- van Poppel, H., Chysky, V., Hullmann, R. und Baert, L., Clinical experience with ciprofloxacin in the treatment of urinary tract infections: a review. *Infection*, 337-344, 1988.
- Vecerek, B., Moll, I., Afonyushkin, T., Kaberdin, V. und Bläsi, U., Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, Nov.:897-909, 2003.
- Wang, J., Brown, M., Tam, S., Chan, M. und Whitworth, J., Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, Jun.:418-420, 1997.
- Whitchurch, C., Alm, R. und Mattick, J., The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep.:9839-9843, 1996.
- Whiteley, M., Bangera, M., Bumgarner, R., Parsek, M. R., Teizel, G. M., Lory, S. und Greenberg, E. P., Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, Okt.:860-864, 2001.
- Wilder, C., Diggle, S. P. und Schuster, M., Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems. *International Society for Microbial Ecology*, Mar.:2011.
- Wilderman, P., Sowa, N., FitzGerald, D., FitzGerald, P., Gottesman, S., Ochsner, U. A. und Vasil, M. L., Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jun.:9792-9797, 2004.
- Wingender, J. und Jaeger, K. E., Extracellular enzymes in biofilms. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 3:1207-1223, 2002.
- Wozniak, D. und Ohman, D., Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by algT. *Journal of Bacteriology*, Oct.:6007-6014, 1994.
- Wu, M., Guina, T., Brittnacher, M., Nguyen, H., Eng, J. und Miller, S. I., The *Pseudomonas aeruginosa* proteome during anaerobic growth. *Journal of Bacteriology*, 8185-8190, 2005.
- Ye, B., Muller, H., Zhang, J. und Gressel, J., Constitutively Elevated Levels of Putrescine and Putrescine-Generating Enzymes Correlated with Oxidant Stress Resistance in *Conyza bonariensis* and Wheat. *Plant Physiology*, Dec.:1443-1451, 1997.
- Yeom, J., Imlay, J. und Park, W., Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. *The Journal of Biological Chemistry*, 285:22689-22695, 2010.

Zhang, L. H., Quorum quenching and proactive host defense. *Trends in plant science*, 238-244, 2003.

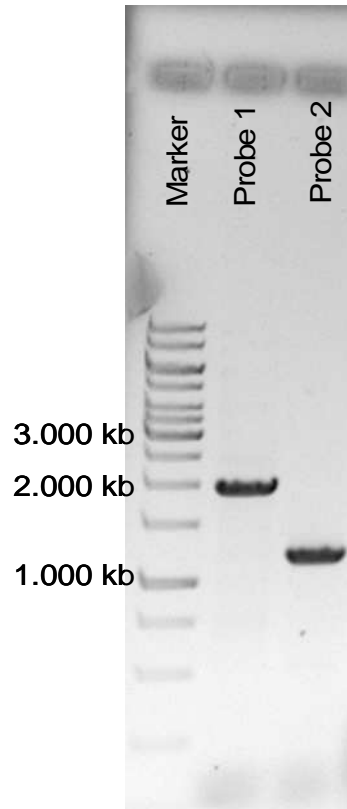
Zielinski, N., Chakrabarty, A. und Berry, A., Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encoding phosphomannomutase. *The Journal of Biological Chemistry*, May:9754-9763, 1991.

Zielinski, N., Maharaj, R., Roychoudhury, S., Danganan, C., Hendrickson, W. und Chakrabarty, A., Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: environmental regulation of the algC promoter. *Journal of Bacteriology*, Dec.:7680-7688, 1992.

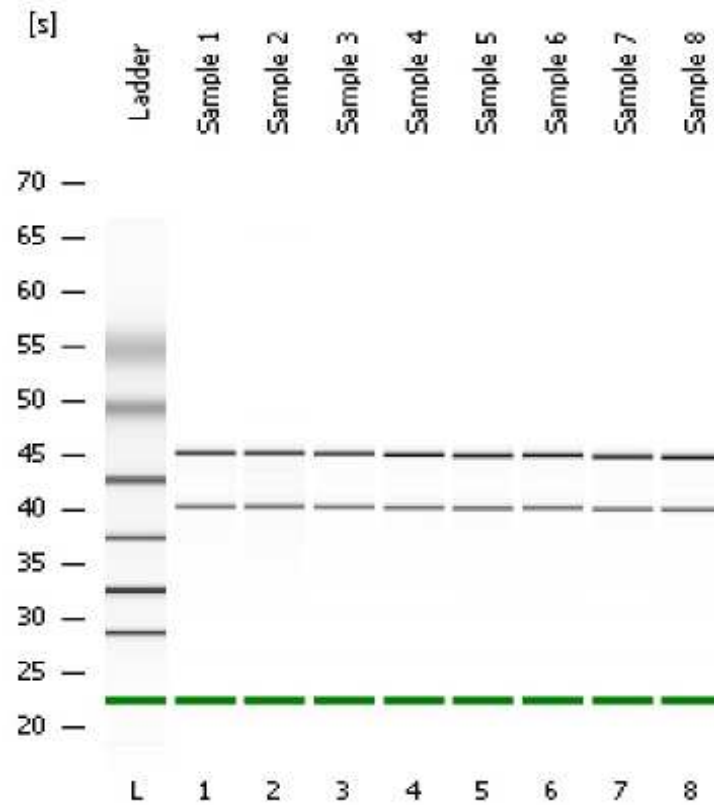
Zumft, W. G., Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 533-616, 1997.



## 9. Anhang



**Abbildung 20:** Fotografie eines 1 %igen (w/v) Agarosegels. Als Marker wurde eine 1 kb DNA-Ladder (Fermentas) verwendet. Probe 1 zeigt ein DNA Fragment nach PCR (Kapitel 2.9.9.) mit den Primern oPT36 und oPT37, die wenige bp vor bzw. hinter dem *fumC1*-Gen von *P. aeruginosa* PAO1 binden. Das DNA Fragment in Probe 2 wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Hier wurden die Primer *fumC1\_forw* (bindet etwa in der Mitte des *fumC1*-Gens) und oPT37 verwendet. Die Fragmente auf dem Gelbild zeigen, dass der zur PCR verwendete Vektor pBBR1MCS5::*fumC1* tatsächlich das *fumC1*-Gen enthält in dem die Primer binden.



**Abbildung 21:** RNA Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer, 2100 Expert, Agilent. Virtuelles Kontrollgel, welches auf dem gemessenen Elektropherogramm basierend erstellt wurde. Das Gelbild zeigt die aufgetrennten RNA-Proben, wobei die beiden Banden jeweils der 16S rRNA (nach 40 sec) und der 23S rRNA (nach 45 sec) entsprechen. Degradierete RNA würde sich als undistinkte Banden in den Gelspuren darstellen.

## Anhang

**Tabelle 21:** Antibiotikaresistenz-Profile der 32 *P. aeruginosa*-Isolate aus Harnwegsinfektionen. Alle Isolate wurden mit kommerziellen Antibiotikaresistenz-Tests der Firma BioMérieux getestet, die speziell für Pseudomonaden (ATB PSE1) und Harnwegs isolate (ATB UR1) konzipiert sind. Die enthaltenen Konzentrationen der Antibiotika entsprechen hierbei den Empfehlungen des DIN Komitees. **R**= resistent, **S** = sensitiv, **I**= intermediär

Antibiotic	Conc. (mg/l)	<i>P. aeruginosa</i> isolate															
		MH5	MH6	MH7	MH8	MH9	RN12	RN13	RN14	MH15	MH16	MH17	MH18 <sup>a)</sup>	MH19	MH20	RN21	MH25 <sup>a)</sup>
Ampicillin	2 – 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin + Sulbactam	2/8 – 8/8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Piperacillin	4 – 32	S	S	S/I	S/I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
Piperacillin + Tazobactam	4/4 – 32/4	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S
Cefazolin	4	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidim 1	1	S	R	R	R	S	I	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S
Ceftazidim	4 – 16	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S
Cefoxitin	4 – 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefuroxim Axetil	1 – 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxim	2 – 8	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	R	R	I	I	R	R
Cefixim	1 – 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefepim	4 – 16	S	S	S	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S
Aztreonam	2 – 16	S	I	I	I	S	I	S	I	I	I	I	I	S	S	S	I
Imipenem	2 – 4	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Meropenem	2 – 8	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
Gentamycin	1 – 4	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	I
Amikacin	4 – 16	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	I
Tobramycin	1 – 4	S	S	S	I	S	S	S/I	S	S	I	S	S	S	S	S	I
Levofloxacin	2 – 4	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Ciprofloxacin	1 – 2	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Cotrimoxazol	16 – 64	R	R	R	R	I/R	R	I/R	R	R	R	R	I	R	R	R	I/R
Nitrofurantoin	64 – 256	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Fosfomycin	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Tetracyclin	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

# Anhang

Antibiotic	Conc. (mg/l)	<i>P. aeruginosa</i> isolate															
		MH26	MH27 <sup>c)</sup>	MH28	MH29	MH30 <sup>c)</sup>	MH33	MH34 <sup>b)</sup>	MH35	MH36	MH37	MH38	MH39	MH54	MH55	MH56 <sup>b)</sup>	MH57 <sup>b)</sup>
Ampicillin	2 – 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin + Sulbactam	2/8 – 8/8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Piperacillin	4 – 32	S	R	I	S	R	S	S	S/I	I	S	I/R	I	R	S	S	R
Piperacillin + Tazobactam	4/4 – 32/4	S	R	I	S	R	S	S	I	I	S	I/R	I	R	S	S	R
Cefazolin	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidim 1	1	S	R	R	S	R	S	I	R	R	I	R	R	R	I	R	R
Ceftazidim	4 – 16	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S	R
Cefoxitin	4 – 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefuroxim Axetil	1 – 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxim	2 – 8	R	R	R	I	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
Cefixim	1 – 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefepim	4 – 16	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	I	I	I	S	S	R
Aztreonam	2 – 16	I	I	I	S	I	S	I	I	I	I	I	I	I	S	I	R
Imipenem	2 – 4	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S
Meropenem	2 – 8	S	I	S	S	I	S	S	S	R	S	I	R	R	S	S	S
Gentamycin	1 – 4	I	R	I	I	R	I	I	R	R	I	R	R	R	I	I	R
Amikacin	4 – 16	S	R	S	I	R	S	S	I	I	S	R	I	R	S	S	R
Tobramycin	1 – 4	S/I	R	S	I	R	S	S	I	I	S	R	R	R	S	S	I
Levofloxacin	2 – 4	S	R	I	S	R	S	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R
Ciprofloxacin	1 – 2	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R
Cotrimoxazol	16 – 64	R	R	R	I	R	I	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R
Nitrofurantoin	64 – 256	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Fosfomycin	32	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Tetracyclin	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

a) Folgeisolat der chronischen Infektion Nr. 1

b) Folgeisolat der chronischen Infektion Nr. 2

c) Folgeisolat der chronischen Infektion Nr. 3

## 10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Gutachtens und dafür, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herrn PD Dr. Ing. Max Schobert danke ich ebenfalls für die Übernahme des Gutachtens, sowie für die unzähligen fachlichen Diskussionen und dafür, dass er immer einige Kontrollexperimente parat hatte.

Herrn Prof. Dr. Ralf.-R. Mendel danke ich sehr für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Bei Dr. Petra Tielen möchte ich mich vielenmalen für die ausgezeichnete Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Sie hat mir stets geholfen einen Sinn in meinen Daten zu erkennen, den ich auf den ersten Blick nicht sehen konnte. Von ihr habe ich gelernt Ergebnisse so zu nehmen wie sie sind und nicht wie man sie erwartet hätte.

Meinen Kollegen Nathalie Rosin, Ann-Kathrin Meyer, Tanja Piekarski, Sebastian Laas, Reinhilde Tüpker, Andrea Wesche, Melanie Burghartz, Wiebke Arendt, Anja Hartmann und Claudia Frädrich danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und ihre große Hilfsbereitschaft.

Dr. Eva Jordan und Dr. Christian Scherling aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schomburg möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Auswertung der Metabolomanalysen danken.

Dr. Neubauer danke ich für die Überlassung der Klinischen *P. aeruginosa*-Isolate und Prof. Dr. Häußler für die Zurverfügungstellung der *P. aeruginosa*-Transposonmutanten.

Ein großes Dankeschön geht auch an den gesamten AK Jahn für die schöne Zeit im Institut und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Marion und Friedrich Narten, die mich immer unterstützt haben meine Ziele zu erreichen. Ohne euch hätte ich es nie geschafft!

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Patrick Narten für sein Verständnis und die vielen aufmunternden Worte bedanken. Er ist der Fels in meiner Brandung.